BAND 25, HEFT 4 FEBRUAR 1956

PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

Unter Mitwirkung von

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley, Keswick-Cumberland / Prof. Dr. Takewo Hemmi, Kyoto / Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler, Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Canberra / Prof. Dr. H. M. Quanjer, Wageningen Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest / Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

herausgegeben von den Professoren

E. Gäumann Zürich

M. Klinkowski Aschersleben

H. Richter Berlin-Dahlem

Mit 44 Abbildungen

1956

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Phytopath. Z. Bd. 25, Heft 4, *S. 333—448, Berlin 1956*

25 FEB 1956

INHALT

Abhandlungen

SANWAL, D. BISHNU, Investigations on the metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc. with the aid of radioactive carbon. With 18 Figures 333

WESTPHALEN, BRIGITTA Gräfin VON, Untersuchungen über *Alternaria porri* (E. M.) Neerg. f. sp. *solani* als Knollenparasit. Mit 22 Abb. 385

GÄUMANN, E. und NAEF-ROTH, ST., Über die chelierende Wirkung einiger Welketoxine. IV. Die Verschiebungen der Toxizität durch steigende Absättigung mit verschiedenen Schwermetallionen. Mit 4 Abb. 418

Kurze Mitteilungen

BERCKS, R., Über die Haltbarkeit von angetrockneten Seren 445

Besprechungen 448

Manuskripte: In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.

„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.

Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

Herausgeber: Prof. Dr. E. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. Klinkowski, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. Richter, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19.

Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 68, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.

Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. Richter, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. Richter vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

Honorierung: Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

Sonderdrucke: Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 20 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Druckbogen.

Bezugsbedingungen: Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,— DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Abonnementspreis dieses Heftes 23,60 DM **Einzelpreis 26,— DM**

From the Department of special Botany of the Swiss Federal Institute of Technology in Zurich

Director: Prof. Dr. E. Gäumann

Investigations on the metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc. with the aid of radioactive carbon

By

BISHNU D. SANWAL

With 18 Figures

Contents: A. Introduction. — B. Materials and Methods: I. Materials. II. Mycological and Pathological Techniques. III. Biochemical Techniques. IV. Isotope Techniques; a) Radioautography and Radiochromatography; b) Preparation of samples for radioactive assay. — C. Metabolism of *Fusarium lycopersici* in vitro: I. Effect of substrate on toxin production. II. Chemical changes in artificial cultures during fusaric acid production. — D. Studies on the metabolism of *Fusarium lycopersici* in vivo: I. The secretion of radioactive metabolic products into the host. II. The distribution of radioactive metabolic products in the host tissues. III. Chemical substances secreted by the pathogen in the host. — E. The role and fate of C^{14}-marked fusaric acid in the tomato plants: I. Decarboxylation of C^{14}-marked fusaric acid in plants under different conditions; a) Effect of pH of C^{14}-marked fusaric acid on $C^{14}O_2$ evolution; b) Effect of continuous light and continuous darkness on the breakdown of fusaric acid. II. The intermediate products of metabolism of fusaric acid. III. Quantitative breakdown of fusaric acid in plants. — F. Discussion. — Summary. — Zusammenfassung. — Literature cited.

A. Introduction

Fusarium lycopersici Sacc., causing a wilt disease of tomato plants, is known to produce three wilting toxins in artificial cultures. These toxins bear no chemical relationship with one another. Thus, *lycomarasmin* (empirical formula $C_9H_{15}O_7N_3$) is a dipeptide with a molecular weight of 277.3 (CLAUSON-KAAS, PLATTNER and GÄUMANN, 1944; PLATTNER and CLAUSON-KAAS, 1944, 1945; PLATTNER, CLAUSON-KAAS, BOLLER and NAGER, 1948;

GÄUMANN, NAEF-ROTH and MIESCHER, 1950). Fusaric acid, the second toxin, is 5n-butylpyridine-2-carboxylic acid (empirical formula $C_{10}H_{13}O_2N$) with a molecular weight of 179. It was first isolated by YABUTA, KAMBE and HAYASHI (1934) from the culture filtrates of *Fusarium heterosporum* Nees. In contradistinction to lycomarasmin, f u s a r i c a c i d is produced by many *Fusarium* species and is not specific to *F. lycopersici* alone (GÄUMANN, NAEF-ROTH and KOBEL, 1952). The third toxin, v a s i n f u s c a r i n (GÄUMANN, STOLL and KERN, 1953) has not yet been completely purified and like fusaric acid is not specific to *F. lycopersici,* but is also produced by *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Woll. (STOLL, 1954). Most probably it is a protein of an enzymatic nature. The pectic enzymes, demonstrated in the cultures of *F. lycopersici* by American authors (DAVIS, 1953; GOTHOSKAR and SCHEFFER, 1953; GOTHOSKAR, WALKER and STAHMANN, 1953; WINSTEAD and WALKER, 1954), may or may not be similar to vasinfuscarin.

When applied to healthy tomato cuttings in particular concentrations, the toxins produce approximately the same symptoms as are present in infected plants. Thus, vasinfuscarin causes the typical browning of the vascular bundles, which is a very striking symptom of naturally infected tomato plants. Lycomarasmin acts specifically on the areas between the midribs of the leaves and causes necrosis there, which again is a typical symptom of the wilt disease of tomato (GÄUMANN, 1951 a). Depending upon the pH, fusaric acid causes either injury to the stems and leaves (at pH 4.3) or to the leaves alone (at pH 6.0 or above, see GÄUMANN, NAEF-ROTH and KOBEL, 1952). The symptoms on the stems take the form of depression of the areas adjoining the vascular bundles and an ultimate collapse of the stem. The leaf symptoms generally appear as water-soaked spots all over the leaves (see LINSKENS, 1955).

Various indirect evidences (GÄUMANN, 1951 a) are available to show that all the above named toxins are also produced by the pathogen in vivo during its pathogenic phase of life. However, these toxins have never been isolated from the naturally infected plants. The reasons are very obvious. Even if we do not reckon with the technical difficulties in the isolation of the minute quantities of toxins elaborated by the pathogen in vivo, we have yet to take into consideration the possibility that these may be metabolised by the host cells with their consequent transformation into unknown substances. We refer here to the general experience of authors who have worked with wilting toxins. Lycomarasmin, for instance, perhaps chelates the iron ions in the tomato plants and thereby changes into a lycomarasmin-iron-complex (GÄUMANN and NAEF-ROTH, 1954, 1955; DEUEL, 1954). Fusaric acid, according to the experience of the Japanese authors (TAMARI and KAJI, 1952, 1953 a, b; DEUEL, 1954), perhaps forms in the plants water insoluble chelate complexes with metal ions. Yet another toxin, patulin, when introduced in the tomato plants, combines with the t h i o l groups of biological importance in the cells and cannot be recovered back (MIESCHER, 1950). We deduce from these observations of a number of authors in this field that it

might not always be possible to isolate the toxins from the diseased plants in the original state in which they were produced by the pathogen. Before we attempt to isolate the toxins from the diseased plants, therefore, we must know the metabolic fate of the toxins in question, once they have been secreted by the pathogen. Only after acquiring such knowledge we can attempt to isolate either the toxins themselves or their degradation products. Success in such isolation would provide a direct evidence for the toxin theory of the wilt diseases.

Apart from the attempt to isolate the toxins from the diseased plants, it is important to follow the metabolism of the pathogen in vivo and correlate such studies with the possible mode of toxin formation in infected plants.

There are, however, many technical difficulties in undertaking investigations of the above nature. The difficulties have been solved to some extent, in the following studies by using C^{14} as a tagging material for both mycelia and fusaric acid (WHEELER, 1952, 1953; HOFFMANN and ZUCKERMAN, 1954; KERN and SANWAL, 1954).

B. Materials and Methods

I. Materials

The strains of *Fusarium lycopersici* used in the following investigations originated from the laboratories of Dr. T. FONTAINE of U. S. Department of Agriculture in Beltsville, Md. (KERN, 1952). Strain R-5-6 built on malt-agar medium large amounts of aerial mycelia and was very strongly pathogenic to tomato plants. Strain 257, on the contrary, built very little, if at all, aerial mycelium and was practically non-pathogenic.

Throughout the following investigations Tuckswood variety of tomato plants were used, unless otherwise stated. They were cultivated in green houses throughout the year with supplement of fluorescent lights during the winter months.

2-C^{14}-glycine was purchased from the Harwell Isotope Center, England. When obtained it had a specific activity of 14.9 μC per mg.

C^{14}-fusaric acid, marked in the carboxyl group was synthesized in the Organic Chemistry laboratories of the Swiss Federal Institute of Technology by Dr. E. HARDEGGER and Mr. E. NIKLES. The original material was very active (14.7 mC/mM) and was diluted by the addition of inactive fusaric acid. To obtain homogeneous material, the mixture of radioactive and non-radioactive fusaric acid was crystallized from petroleum ether.

II. Mycological and Pathological techniques

The inoculum for general experiments discussed in Section C (I) was obtained by growing the fungus on rice cultures (20 gms. rice and 40 ml. water; sterilized in Autoclave) for 5 days. At the end of this period the

fungus built large quantities of conidia. For the inoculation of liquid cultures, the rice cultures were gently shaken with 100 ml. sterile distilled water to obtain a spore suspension. 1 ml. of this spore suspension was used to inoculate 100 ml. of liquid substrate.

For studying the metabolism of fusaric acid in vitro, discussed in Section II, the inoculum had to be much more uniform. To this end, single conidial cultures were made on solid malt-agar slants and one of those conidial cultures served as the mother culture for all subsequent sub-cultures. Whenever needed, sub-cultures were made on solidified Richard's medium (subsequently abbreviated in the following work as Ri_5 medium) in petri dishes. After 5 days growth at 27 ° C in darkness, uniform discs of agar with mycelium were cut out from the periphery of the petri dishes by means of a flamed cork-borer and these discs served as the source of inocula for the liquid cultures in Erlenmeyer flasks.

Unless otherwise stated, Erlenmeyer flasks of 500 ml. capacity were used throughout. Each flask contained 100 ml. of Ri_5 medium (modified after LUZ, 1934: 50 gms. glucose, 10 gms. ammonium nitrate, 5 gms. monopotassium phosphate, 2.5 gms. magnesium sulphate and 0.02 gms. ferric chloride, distilled water to make up 1000 ml.). The medium had a pH of 4.0—4.2. It was sterilized in an Autoclave at a pressure of 1 atm. for 20 minutes.

All cultures were incubated in dark at a temperature of 27 ° C.

Dry weight of the mycelium was taken as a standard of the amount of growth of the mycelium. For dry weight determinations, the contents of 10 Erlenmeyer flasks were filtered through a weighed filter paper. The mycelium was washed with 50 ml. distilled, luke-warm water 4 times and was dried along with the filter paper for 12 hours at 60 ° C and further 4 hours at 103 ° C and weighed.

The method of inoculation of the tomato plants was the same as proposed by WELLMAN (1938). They were inoculated at the four leaf stage by uprooting them from the soil and dipping the washed roots in a mycelial and conidial suspension and again planting in soil. Controls were treated in a similar way (KERN, 1952).

Tomato wilting tests were the same as proposed by GÄUMANN, NAEF-ROTH and MIESCHER (1950) and GÄUMANN, NAEF-ROTH, REUSSER and AMMANN (1952). The tomato plants were cut at the four leaf stage by means of a sharp razor and immediately placed in water. They were allowed to take up the required dose of the toxin by means of transpiration pull under similar conditions of temperature, humidity and light. After uptake of the test solutions, the plants were placed in tap water and symptoms checked after 48 hours (LINSKENS, 1955).

The *Ustilago* spore germination tests were made according to the method proposed by KOBEL (1951) and KERN (1952) and the results were expressed as *Ustilago* units per ml. of the test solutions (U/ml.), i. e., the dilution of the original solution at which only 50 % of the control smut spores germinate.

III. Biochemical techniques

a) Glucose determination

Glucose was estimated as reducing sugar by the method of SCHAFFER and HARTMANN (1920) by iodometric titration. 2 ml. of clear culture filtrate was added to a mixture of 25 ml. of copper sulphate ($CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$; 69.28 gms. dissolved in 1 liter distilled water) and 25 ml. of Rochelle salt solution (346 gms. Rochelle salt with 100 gms. of sodium hydroxide dissolved in 1 liter distilled water) in a flask. Distilled water was added to this solution to make up the total volume to 100 ml. The flask, with its contents, was heated quickly to boiling and after allowing it to boil for 2—3 minutes, rapidly cooled under the tap. To this was added 50 ml. of potassium iodate-iodide solution (5.4 gms. KIO_3 and 60 gms. KI with a small amount of alkali, distilled water to make up 1 liter) followed by approximately 15 ml. of 5 N H_2SO_4. Immediately afterwards, 20 ml. of a saturated solution of potassium oxalate was added to dissolve completely the cuprous iodide formed. This solution was titrated with 0.1 N sodium thiosulphate, using towards the end some drops of a starch solution as an indicator. A blank also was run side by side in boiling the Fehling's solution, using distilled water instead of the culture filtrate. The former titration value was subtracted from the latter blank and the milligram copper equivalent was calculated out (1 ml. 0.1 N $Na_2S_2O_3$ corresponds to 6.36 mg. copper). From this value, the glucose present in the culture filtrate was calculated out by reference to the MUNSON-WALKER tables (Methods of analysis of the Association of official Agricultural chemists, 1950).

b) Determination of total nitrogen

Total nitrogen in the culture filtrates was determined by the method of PEPKOWITZ and SHIVE (1942). 1 ml. of clear culture filtrate was filled into a thick-walled boiling tube and evaporated to dryness under vacuum. Then 1—2 ml. of Ranker's solution (32 gms. salicylic acid dissolved in 1000 ml. concentrated sulphuric acid) was added and allowed to stand in the cold for 20—30 mts. To this were added 3 drops of sodium thiosulphate solution (50 gms. of sodium thiosulphate monohydrate per 100 ml. of distilled water) and 0.5 ml. of selenium oxychloride-sulphuric acid solution (12 gms. of selenium oxychloride per liter of conc. H_2SO_4). The contents of the test-tube were vigorously boiled for 15 minutes and then cooled, first at room temperature and then under cold tapwater. 2 drops of a 35 % perchloric acid (made from 70 % acid with distilled water) solution were added right in the middle of the tube by means of a pipette and the tube heated for 15 minutes in the digestion rack over a low flame so that the temperature remained below the boiling point. The test tube at the end of this operation was cooled again, the contents diluted with cold distilled water to a volume of 30 ml. and nitrogen estimated in 10 ml. lots of this solution by the method discussed under the determination of ammonia. A blank

check was similarly run (without culture filtrate) to correct for nitrogen which might be present in the reagents as impurity.

c) Determination of ammonia

Ammonia was determined by the method proposed by RAYNAND (1948). To 1 ml. of clear culture filtrate was added approximately 20 ml. of 95 % ethyl alcohol along with a drop of 1 % alcoholic solution of Thymolphthalein. The whole solution was neutralized by 0.01 N NaOH till the colour turned blue, after which a little more alkali was added to get an alkaline reaction. When the original culture filtrate or solution (as in KJELDAHL nitrogen determinations) was very strongly acidic, neutralization was begun with conc. NaOH and ended up with 0.01 N NaOH solution. The alkalinised solution was placed in a steam distillation apparatus, the original container rinsed three times with 3—5 ml. quantities of 95 % alcohol and the rinsings combined with the original solution. The receiving flask contained, before the distillation was started, 2 ml. of 95 % alcohol with 2 drops of 1 % alcoholic sodium alizarine sulphonate. Steam was now turned on and distillation continued till all the alcohol was collected in the distillate. The pink coloured distillate was then titrated to neutrality by means of 0.02 N H_2SO_4, delievered from a microburette. Milligrams nitrogen present in the distillate were calculated in multiplying by 0.28 the number of ml. of 0.02 N H_2SO_4 used.

d) Determination of nitrate nitrogen

Nitrate was determined by a volumetric method described by TREADWELL (1947). 2 ml. of clear filtrate were taken, made acidic by adding a little 2 N H_2SO_4 and diluted with distilled water to 70—80 ml. This solution was heated to boiling and to it was added 15 ml. of a solution of Nitron reagent (10 gms. Nitron dissolved in 5 ml. of acetic acid and 95 ml. distilled water). The container was immediately placed in ice-cold water and left there for 2 hours. During this time the nitrate salt of Nitron crystallizes out of the solution because of its non-solubility. The crystals were separated by means of a glass Gooch crucible (GOOCH G 3), washed three times with 3—5 ml. distilled water and allowed to dry in an oven for 2 hours at 110 ° C. From the weight of the Nitron nitrate, so obtained, the milligrams of nitrate nitrogen were calculated.

e) Determination of amino-nitrogen

A method proposed by POPE and STEVENS (1939) was adopted (see also, SCHROEDER, KAY and MILLS, 1950). 10 ml. of the clear culture filtrate were pipetted in a 50 ml. volumetric flask, 2 drops of 1 % alcoholic Thymolphthalein solution followed by N NaOH were added till the colour turned blue. To this solution were added approximately 30 ml. of copper phosphate suspension (made by mixing 1 vol. of 0.16 M solution of copper chloride with 2 vols. of borate buffer, made by dissolving 28.6 gms. sodium borate

with 50 ml. N HCl in 700 ml. water and 2 vols. of a solution containing 64.5 gms. dihydrogen phosphate plus 7.2 gms. sodium hydroxide per liter, the volume made up to 50 ml. by adding distilled water, mixed well and the whole solution filtered through a Whatman filter paper no. 5. The copper content of the filtrate was determined iodometrically. To 10 ml. of the filtrate was added about 1 gm. of potassium iodide dissolved in water and acidified with about 0.5 ml. acetic acid. The free iodine was titrated by 0.01 N sodium thiosulphate, using a microburette for the purpose and adding a starch solution (Pope and Stevens, 1939) as an indicator towards the end of the titration. Milligram amino-nitrogen present in 1 ml. culture filtrate was calculated as follows (see Schaffer und Hartmann, 1920—21):

$\frac{t \times 0.28}{2}$ = mg. amino-N in 1 ml. of culture filtrate (where t = the amount of 0.01N $Na_2S_2O_3$ used for titration).

f) Determination of purine nitrogen

The method of Krüger and Schmid (1905) for determination of purine bases was used (see also, Hitchings and Fiske, 1941). 30 ml. of deproteinized culture filtrate was neutralized to phenolphthalein and heated in a boiling water bath. The purine bases were precipitated by adding 2 ml. of a 40 % solution of sodium bisulphite and 2 ml. of a 10 % solution of copper sulphate. The mixture was set to boiling and continued for three minutes. The precipitate was centrifuged and washed successively with 1 % acetic acid and 10 ml. portions of hot water. The precipitate was handled in the same way as in the determination of total Kjeldahl nitrogen discussed in part b).

g) Fusaric acid nitrogen

This part of the analytical work presented the most difficulties. In order to determine the nitrogen of fusaric acid we had to obtain it in pure form. We tried to extract the fusaric acid from the culture filtrates from model experimental cultures, where a known quantity of fusaric acid was added to the culture filtrate immediately after sterilization and extracted with the method used by Plattner, Keller and Boller (1954). The culture filtrate was mixed with Norit (Norit superactive coal 0.5 %) twice and well mixed in a vibrator. By applying suction, the coal with the adsorbed fusaric acid was separated from the culture fluid in a Buchner funnel. The fusaric acid was eluated first by methanol and lastly by methanol-ammonia. All the methanol extracts were combined and reduced to a very small volume (calculated to contain about 1 mg. fusaric acid/ml.). A known quantity of this solution was applied as a band, about 3 cms. long on the starting line of a Whatman paper no. 1 and the chromatogram run with secondary butanol, formic acid and water mixture (75 : 15 : 10). After drying the chromatogram the fusaric acid band was cut out, eluated and quantity of fusaric acid determined by ultra-violet absorption in a Beckmann spectro-

photometer (for further details see ZÄHNER, 1954). Using such a procedure it was found that absorption on active coal does not remove all the fusaric acid from the culture filtrates. In very favourable cases a recovery of about 55 % is obtained.

In view of the above we were obliged to take recourse to other methods of extraction. After a good deal of experimentation, the following method was adopted, which gave an error of round 10 %:

300 ml. of a clear culture filtrate was adjusted to a pH of 4.0 and extracted 5 times with 80 ml. of ethyl acetate. All the ethyl acetate was combined and completely dried under vacuum at room temperature. The solid material was taken up in 1 ml. of 80 % ethanol and 0.05 ml. of this solution was applied as a 5 cms. long band on WHATMAN no. 1 chromatographic paper. The chromatogram was run with the elsewhere mentioned butanol-formic acid and water mixture. After drying, the position of fusaric acid was located under ultra-violet light. The band was cut and eluated with about 5 ml. of ethanol in a WASITZKI eluation apparatus (MORTON, 1938). The eluate was dried in a thick-walled boiling tube and handled in the same way as described in section b).

h) pH determination

All pH measurements were done with a glass electrode.

IV. Isotope techniques

a) Radioautography and Radiochromatography

In the following work, depending upon requirements, radioautography has been used either on a 'macro' or a 'micro' scale. In the 'macro' work, like in the radioautography of developed chromatograms (where only a rough image is required to locate the radioactive spots on chromatograms), No-Screen X-ray films manufactured by EASTMAN KODAK Co., U. S. A., have been used. The chromatograms, after drying, were stamped on the edges with radioactive ink (SANWAL, 1955) in order to mark its position on the X-ray photographic emulsion after development. The chromatogram in contact with the emulsion was covered with black paper and a lead weight of the same size as the film was put on top of it. This procedure ensured a close contact of the chromatogram with the emulsion and an uniform distribution of pressure on the whole film (since it is known that unequal pressure can give rise to artefacts). The films were exposed in a light-tight box at 0° C for the required number of days. The time required to obtain a satisfactory development of the silver grains (in general, an optical density of $D = 0.5$ over the controls) depends on the activity of the radioactive spots and was always found out empirically (generally, one square centimeter of the emulsion must receive 10^6 disintegrations to get a satisfactory image, see KAMEN, 1951; SANWAL, 1955). After exposure the emulsion was developed with KODAK rapid X-ray developer for 8 minutes and fixed in an

acidic fixing bath. The position of the radioactive spots was determined by viewing the radioautograph through scattered light.

In the 'micro' work, as for instance, radioautography of thin tissue sections to locate the distribution of radioactive substances in the cells, two types of film emulsions were used. The 'stripping emulsion' (PELC, 1947) was obtained by the courtesy of Prof. Dr. J. EGGERT of the Department of Photography, Federal Institute of Technology, Zurich, to whom the writer is grateful for general advice on photography. This emulsion was manufactured by KODAK Co., England and consisted of a glass plate on which the dried emulsion was spread in a layer 4 μ thick with another supporting gelatine layer at the top.

The microscope slides to be used for mounting the tissue sections, containing the radioactive material, were 'subbed' before use, i. e., they were cleaned by soaking overnight in a solution containing the following constituents:

Potassium dichromate	100 gms.
Sulphuric acid (conc.)	100 ml.
Distilled water to	1000 ml.

They were next washed in water and dipped in the following solution at 18 ° C.

Gelatine	5 gms.
Chromealum	0.5 gm.
Water to	1000 ml.

After this treatment the slides were dried overnight at 30 ° C. This treatment obviated the use of a sticking substance for holding the paraffin sections of the tissues. The paraffin ribbons were laid on top of the slides so treated, stretched by heating at 40 ° C, dried and stored till required for use. For exposure of the 'stripping emulsion', pieces were cut out from the plate, sufficient to cover the entire area of the paraffin ribbons on the 'subbed' plates plus a margin about 8 mm. all round (HERZ, 1951; PELC, 1947) by means of a sharp knife and floated on the surface of distilled filtered water, with the emulsion surface facing downwards. The dried emulsion, on coming in contact with water stretched itself. The slide bearing the specimens was so placed under the emulsion layer that it formed an angle of 30 ° from the horizontal and one side touched the emulsion first. The whole slide, with the emulsion, was lifted clear of water and dried by means of a stream of cool air, placed in a light-tight box and exposed for the required length of time (maximum time of exposure 40 days).

The other kind of photographic emulsion used was the NTB (nuclear track plates) 'slide-coated' emulsion manufactured by EASTMAN KODAK Co., U. S. A. These plates carried an emulsion layer 10 μ thick coated directly on a microscope slide (1 inch $\times$ 3 inches). To expose these plates, the paraffin ribbons were first stretched at 40 ° C over a hot plate and were immediately

floated on filtered distilled water. The emulsion on the slides was wetted by immersing it under water for 1 minute and the ribbons laid over the emulsion, dried by means of a stream of cool air and exposed in light-tight boxes at 0 ° C for the required length of time (EVANS, 1947).

After the desired exposure (found out empirically) the plates were washed in xylol for about 15 minutes to remove the paraffin in order to facilitate later the penetration of the processing material through the sections. They were then dried for about 10 minutes (when it did not smell of xylol any more) and developed with KODAK D-19 b developer for 20 minutes without agitation. Next, they were rinsed in water and fixed in KODAK F 5 fixing bath about 40 minutes, after wich they were washed thoroughly with running water (1 hour). Staining of the sections, directly over the emulsion, was done by haematoxylin with 4 % iron-alum serving as a mordant. Staining time had to be varied with different tissues and was largely determined empirically. The developed and stained plates were next dehydrated through various grades of alcohol, cleared in xylol and mounted in canada balsam with a cover slip of convenient size on top.

Except staining, all operations were carried out in light from a Wratten series 1 safelight (red). Whenever radioactivity was present in the tissues, the silver grains directly over these areas were developed. Thus, by examining slides prepared in the manner described above under a microscope, one could determine exactly which tissues had accumulated radioactive substances.

Radiochromatography:

For want of any other suitable name we have called this technique radiochromatography (LISSITZKY and MICHEL, 1952; ROCHE, LISSITZKY and MICHEL, 1954; SANWAL, 1955); it has been the most widely applied technique for research with radioactive isotopes. The following procedure was adopted by us:

A drop of mixture, containing radioactive substances to be separated was applied on the starting line of Whatman no. 1 chromatographic paper. The drops were delivered from a micropipette and it was rinsed after use everytime, first with distilled water, then with alcohol and finally with acetone and dried. Separation on the chromatogram was achieved by the desired solvent mixture unidimensionally in an all-glass pyrex chromatographic container by the descending method. The chromatogram was then dried and strips, about 3 cm. wide (containing the radioactive spots), were cut out in a longitudinal direction. This strip of paper was enclosed in a small aluminium casket which had at one end a rectangular opening of 4 mm. × 20 mm. The opening was placed under a thin end-window Geiger-Müller counter, the distance between the counter and the paper being 5 mm. The paper strip was counted 4 mm. by 4 mm., beginning with the starting point on the chromatogram to the solvent front by moving the chromatogram after every measurement 4 mms. This movement was facilitated by a scale fitted under the aluminium casket. Each portion was counted for 5 minutes. The counts per minute were plotted against distance on the chromatogram

to obtain a radiochromatogram. The maxima on the radiochromatogram corresponded to the radioactive spots present on the paper chromatogram. By reference to the distance of such radioactive spots from the starting point and the solvent front, R_f values could be easily calculated out.

b) Preparation of samples for radioactive assay

All the radioactive samples, unless otherwise stated were counted as barium carbonate. The combustion apparatus was constructed after Anderson, Delabarre and Bothnerby (1952) and is shown in figure 1. It consisted of a forked combustion tube at one end and a receiving flask on the other, with arrangements for evacuating the whole apparatus quickly (see legend to figure 1). All samples were oxidized using the wet combustion technique of Van Slyke et al (1940, 1951 a and 1951 b) using the following procedure:

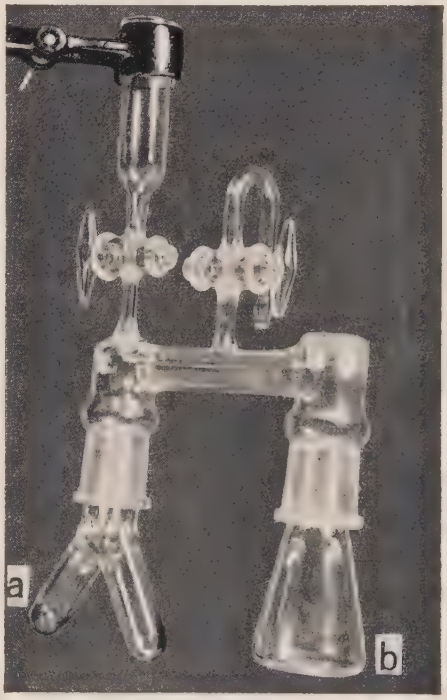

Fig. 1. Combustion apparatus for burning the radioactive samples by the Van Slyke wet combustion method. a = forked combustion tube. b = $C^{14}O_2$ absorption flask (Photo: G. Bazzigher)

In case of liquid samples to be oxidized, the liquid was placed in one arm of the forked combustion tube (previously weighed) and evaporated to dryness at room temperature under vacuum. The dried sample then was oxidized as written below. In case of tissue fractions or solid samples, they first were dried under vacuum over phosphorous pentoxide at room temperature, weighed and placed into one arm of the forked combustion tube. In no case (either of liquid samples or solid samples) the weight did exceed 15 milligrams. When measurements were to be made on a large amount of tissue, as for instance, whole plants, the plants were cut up in small individual parts, dried, weighed and then oxidized.

Oxidation of the samples was done by placing in one arm of the forked combustion tube, along with the samples, the corresponding amount of Van Slyke-Folch solid reagent (2 parts by weight of KIO_3 and 1 part of $K_2Cr_2O_7$; Van Slyke, Plazin and Weisiger, 1951). The other arm of the combustion tube received a corresponding amount of liquid reagent (67 ml. of fuming sulphuric acid with a free SO_3 content of 20 %, 33 ml. of H_3PO_4 of sp. gr. 1.70—1.72 and 1 gm. of KIO_3, all three heated together to dissolve the KIO_3, cooled and stored in a clean Pyrex-

glass bottle.). The liquid reagent was always freshly made before use. In the receiving flask, on the other end of the apparatus, was placed 15 ml. 2 N carbonate free NaOH solution having a blank of about 3—4 mg. $BaCO_3$ per mole of NaOH.

The whole apparatus was quickly evacuated of air and the contents of the arm of the combustion tube containing VAN SLYKE-FOLCH reagent were tilted into the arm containing the solid reagent with the sample to be oxidized. The mixture was strongly heated for 5 minutes by an open flame applied directly under the tube. After removing the flame, the whole apparatus was left for 30 minutes with occasional shaking by hand to facilitate complete absorption of the liberated $C^{14}O_2$ in NaOH solution. After all the $C^{14}O_2$ had been absorbed, the receiving flask was removed and the contents rinsed into a clean dried centrifuge tube followed by an amount of 2 N ammonium nitrate sulution equivalent to the alkali used, and immediately stoppered with an ascarite tube to protect the contents from atmospheric CO_2. The centrifuge tube was then immersed immediately in a boiling water bath and allowed to remain there for about 15 minutes, after which the ascarite tube was removed and 10—15 ml. of a solution of $Ba(OH)_2 \cdot BaCl_2$ (for preparation see ANDERSON, DELABARRE and BOTHNERBY, 1952) were added from a burette protected from atmospheric CO_2 to precipitate the $BaC^{14}O_3$ from the solution. The centrifuge tube was again stoppered and placed in a water bath maintained at 90^0 C for 30 minutes. The crystalline $BaCO_3$ precipitate was centrifuged out, washed first with hot distilled water, then with alcohol and from this the samples for radioactive assay were made as follows:

The $BaCO_3$ precipitate was ground under absolute alcohol by means of a pyrex glass rod and the alcohol-barium carbonate slurry so obtained was transferred by means of an eye-dropper to small aluminium counting discs (area 3.47 sq. cms.). The alcohol was evaporated from the discs by drying the precipitate under an infra-red lamp and finally in an oven at 115^0 C for one minute (YANKWICH, 1948). Such preparations, if not immediately counted were stored in a dessicator over dry NaOH pellets till further use.

It might be mentioned here that the $BaCO_3$ precipitate obtained by other procedures than those described above (see also REID, WEIL and DUNNING, 1947; CALVIN, HEIDELBERGER, REID, TOLBERT and YANKWICH, 1949) is 'growing' and has a tendency to stick on the glass walls of the dropper while transferring to counting discs. Besides this, the 'growing' precipitates never dry on the discs uniformly and this invariably results in serious counting errors due to the ununiform geometry of the sample (KAMEN, 1951; CALVIN et al, 1949).

Counting of the samples and corrections applied:

Counting was done by means of an end thin window Geiger-Müller counter. A "1000 Scaler" of TRACERLAB, Boston, Mass. and a ELA 2 64-scaler

of Landis & Gyr A. G., Zug, Switzerland with a EQB 1 GM-tube having a window diameter of about 25 mm and thickness of about 2 mg/sq. cm, were used. The samples were counted always at a fixed distance from the window.

Samples having less than 100 counts per minute were counted for at least 30 minutes and those having greater activities were counted from 5 to 15 minutes depending upon the activity. Background counts were taken before and after every measurement for at least 5 minutes and were subtracted from the total counts of the samples in expressing the data.

The standard deviation of a series of measurements on the radioactive samples and background was calculated out from the formula (Calvin et al, 1949):

$$\text{standard deviation} = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}(V_{mean} - V_i)^2}{n(n-1)}}$$

where n = number of determinations made; V = mean value of the counts; V_i = individual counts.

Counts on any radioactive sample showing less than 3 times the standard deviation of background counts were taken as not significant of the presence of radioactivity in them.

The self-absorption correction for weak β-rays emitted by C^{14}, whenever needed, was done by reference to a curve obtained by counting different quantities of $BaCO_3$ samples of the same specific activity (Yankwich, Norris and Juston, 1947). All the $BaCO_3$ samples counted were either of 'infinite thickness' (about 20 mg./sq. cm.) or whenever less, were corrected to this value by reference to the aforesaid absorption curve. Only in experiments reported in section E, I (page 366) we took recourse to reducing the counts obtained to 'zero thickness' (see Yankwich et al, 1947), because the samples were very weakly radioactive due to an enormous dilution with non radioactive CO_2 given off by the plants. This correction was also done by reference to the absorption curve.

Greatest cleanliness was observed while working with the radioactive material. All the glassware and discs were cleaned immediately after use with dilute HCl, boiling distilled water, alcohol and finally with acetone and checked for any possible radioactive contamination under the GM counter before use.

C. Metabolism of *F. lycopersici* in vitro

I. Effect of substrate on toxin production

It has been demonstrated by Gäumann, Naef-Roth and Miescher (1950) that the avirulent strain of *F. lycopersici* produces more lycomarasmin in artificial cultures than the virulent strain. Kern (1952) confirmed this observation and further showed that both lycomarasmin and fusaric acid are produced in greater quantities by the avirulent strain than the virulent one but the difference was not very significant (Kern, 1952, fig. 5) specially in

wilting tests with tomato cuttings. However, in the face of the facts, the situation is anomalous specially if we were to assume that the disease syndrom in the host is the result of the action of toxins secreted by the pathogen in vivo. If the latter contention were true, we would expect that the virulent strain produce more toxin in artificial culture than the avirulent one. This is also the line of argument taken by DIMOND and WAGGONER (1953). GÄUMANN (1951 a) has explained this situation by putting forth the argument that "the microorganisms respond in their metabolism and formation of the toxins with extreme sensitivity to nutritional minutae. *Claviceps purpurea* forms ergotamine and its other alkaloids in the parasitic phase in the ovaries of the grasses, but not on the same substrate in saprophytic culture. *Penicillium chrysogenum* and *P. notatum* pruduce penicillin only when the nutrient solution contains Zinc: without zinc they produce notatin. Certain races of *Aspergillus fumigatus* form gliotoxin after a short incubation period. and helvolic acid after a longer period . . . The same differential stimulation or inhibition of toxin formation evidently occurs with the various strains of *F. lcyopersici* with other *Fusarium* species in the interior of the host or, respectively, in saprophytic culture."

In view of the above reasoning, experiments were conducted to arrive at an answer to the following questions:

1. Does the quantity of toxin produced by the virulent and avirulent strains vary with a quantitative change in the chemical constitution of the modified Richard's medium?

2. Are toxins produced when there is a qualitative change in the constituents of the medium? This part of the experiment was also conducted to search the possibility of a cheap source of radioactive carbon to be utilized in later experiments.

1. Influence of the quantitative composition of Richard's medium on toxin production:

Since all the known toxins (cf. Introduction) produced by *F. lycopersici* in artificial culture have carbon and nitrogen as chemical constituents, it was decided to vary the concentration of these two substances in the Richard's medium arbitrarily. In one set of flasks (500 ml. capacity, each containing 100 ml. liquid medium), the strains were grown on Richard's medium having only half the normal amount of sugar (2.5 %, instead of the normal 5 %) and all the other constituents in normal amounts. In the second set of flasks, only half of the normal amount of nitrogen (0.5 %, instead of normal 1 %) with the usual amounts of other constituents were provided. In the third set of flasks, only half of the usual amount of sugar and half of the usual amount of nitrogen was provided along with the normal quantities of other constituents of the Richard's medium. The fourth set of flasks served as controls and contained the unvaried Richard's medium.

Strains R-5-6 (virulent) and 257 (avirulent) were grown at 27° C in dark for five week duration. At the end of every week 10 flasks (from each

set) were removed, the contents mixed together and filtered. The filtrate was tested both with wilting (in 1/5 dilution; gradation of symptoms as in KERN, 1952) as well as with the Ustilago spore germination tests (page 336) after adjusting the pH to 6.0. pH changes in the medium were followed for the whole growth and test period to find out whether any correlation exists between the two factors.

The results of these investigations are summarized in figures 2—4.

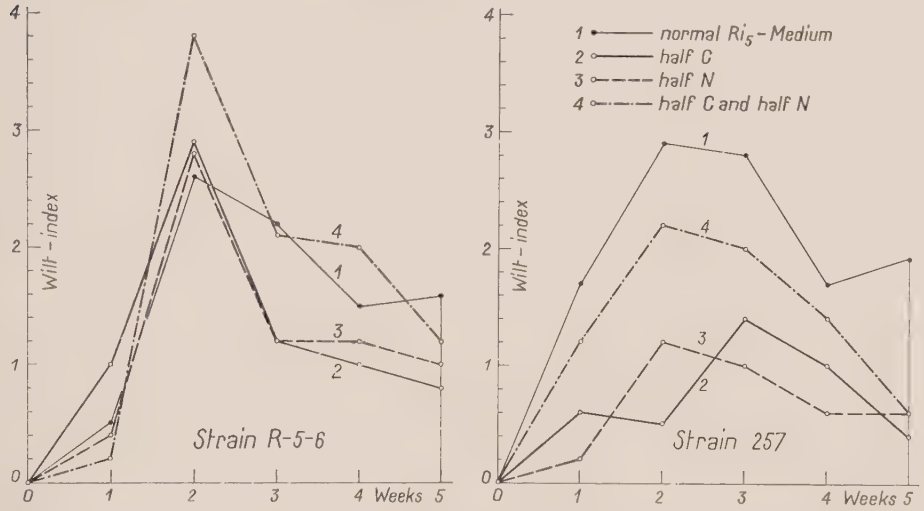

Fig. 2. The effect of a quantitative change in the constitution of Ri_5 medium on the toxin production by strain R-5-6 and 257 as assessed by wilting tests (concentration 1/5 dose 0.25 ml per gm test plants)

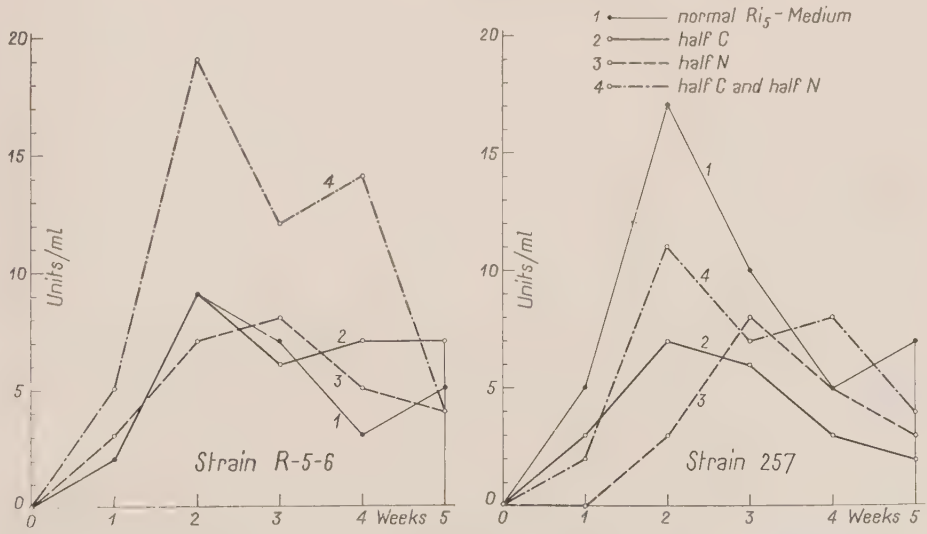

Fig. 3. *Ustilago* activity of the culture filtrates (in dilution units) of strain R-5-6 and 257 grown in Ri_5 medium the constituents of which were varied quantitatively

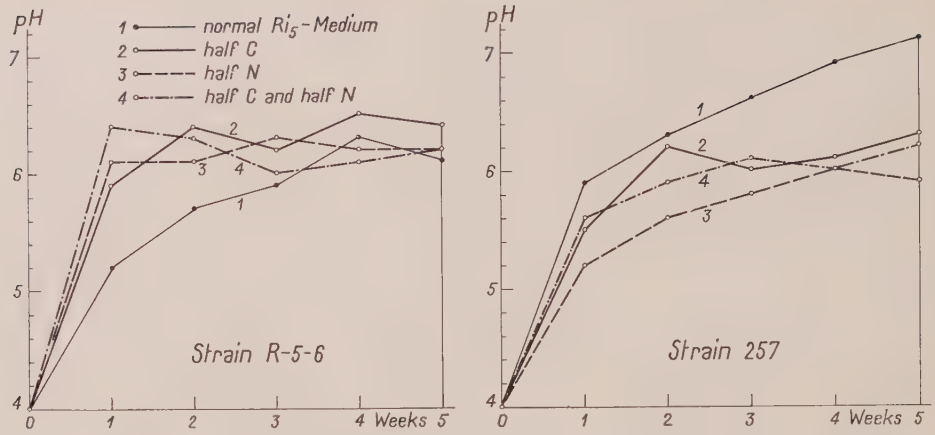

Fig. 4. Change in the pH of cultures of strain R-5-6 and 257 grown on modified Ri_5 media

The following generalizations can be made from a study of the figures 2—4:

a) There is no correlation between pH and the quantity of toxins secreted by the two strains of *F. lycopersici.* This is clearly borne out from a study of the corresponding curves (figs. 2—4). pH of the media employed, originally at about 4.0, rapidly increases till a seven-day-period and thence afterwards remains more or less constant (fig. 4). As will be seen later (page 354), this rise in the pH is correlated with the accumulation of ammonia and active uptake of nitrates from the medium. On the contrary, the quantity of toxins produced by both strains reaches a maximum after 14 days and thereafter gradually falls down.

b) With half the normal amount of glucose (2.5 % only) and half of the normal amount of nitrogen (0.5% only) in the Richard's medium, the virulent strain (R-5-6) produces more toxin than the avirulent (257) one (figs. 2—3). This is specially pronounced at the end of a growth period of two weeks, when toxin production always reaches a maximum. The curves obtained with the wilting tests (figure 2) and also with the *Ustilago* spore germination tests (fig. 3) speak for the above generalization. At the end of 2 weeks, the toxin production in both the virulent and avirulent strains takes a similar course. The above also holds true for cultures grown with either only half glucose or half nitrogen.

c) With a favourable balance of carbon : nitrogen (i. e., 2.5 % carbon : 0.5 % nitrogen), the toxin production is always more than an unfavourable balance (i. e., 2.5 % carbon : 1 % nitrogen or 5 % carbon : 0.5 % nitrogen) in both the strains. The carbon nitrogen balance of the culture medium is also known to influence the organic acid metabolism of many moulds (FOSTER, 1949).

d) The toxin production shows a sharp rise during the second week and a sudden fall during the third week in the case of strain R-5-6; in the case of strain 257, however, the rise and fall is not sudden (figs. 2 and 3).

2. Influence of the qualitative change in the composition of RICHARD's medium on toxin production:

It has been demonstrated above that a quantitative change in the constitution of the substrate causes a corresponding change in the quantity of toxins produced by *F. lycopersici*. It yet remained to be seen whether toxins could be produced by this organism in a substrate having other sources of carbon than glucose. GOTTLIEB (1944) had earlier shown that various amino-acids could be used as the exclusive carbon sources in the medium for the growth of *F. lycopersici*. Preliminary experiments showed that with various amino-acids as the carbon sources (e. g., aspartic acid, glutamic acid etc.) the fungus did not produce significant quantities of toxins, even though growth took place. However, when 2.5 % glycine was used as the sole carbon source, toxin production was quite comparable to that produced by glucose. After preliminary experiments it was found that the best medium for the optimum production of toxins was: 25 gms. glycine, 7 gms. ammonium nitrate, 5 gms. monopotassium phosphate, 2.5 gms. magnesium sulphate, 0.02 gms. ferric chloride, distilled water to make up 1000 ml. Growth in this medium, however, was not comparable to the RICHARD's medium, nevertheless toxin production was optimum.

Strains R-5-6 and 257 of *F. lycopersici* were grown in 500 ml. Erlenmeyer flasks with 100 ml. of glycine medium in dark at a temperature of 27 ° C for different lenghts of time. At regular intervals of 7 days, 10 flasks from each series were removed, freed from mycelium and the culture filtrate tested for the presence of toxins by the wilting tests (in 1/5 dilution) and also by Ustilago spore germination tests. Figures 5 and 6 represent the results of this investigation. Although not included in these figures, vasinfuscarin was regularly present in the culture filtrates from the beginning of the 7 th day to the end of 6 weeks.

The following conclusions can be drawn from a study of figures 5 and 6:

a) Toxins (lycomarasmin, fusaric acid and vasinfuscarin) are produced by the two strains during their growth in the glycine medium.

b) Toxin production, as assessed by the tomato wilting tests, steadily increases in the culture filtrates of both the strains till the 4 th. week and subsequently falls down to a minimum at the end of 6 weeks (fig. 5).

c) As assessed by the *Ustilago* spore germination tests, toxin production reaches a maximum at the end of a 2 week growth period and subsequently falls down in both the strains.

d) In the glycine medium, strain 257 produces more toxin than the strain R-5-6. The difference, however, is not so significant as in the RICHARD's medium.

With the above facts in hand, we can discuss the questions we asked ourselves at the beginning of these experiments. It has been demonstrated that, by varying the chemical environment, a corresponding variation also occurs in the quantity of

toxin production. Thus, under certain conditions, the virulent strain produces more toxin in vitro than the avirulent strain under precisely the same conditions. This is not surprising, since the microorganisms are known to be fastidious in this regard (GÄUMANN, 1951 a; TUREL, 1952; KERN, 1952; SAUTHOFF, 1955). This fact, however, may have a bearing on the toxin production in vivo. The chemical environment in the plants is not the same as in the laboratory cultures, and as we have shown, by a change in the chemical environment a corresponding shift also occurs in the toxin pro-

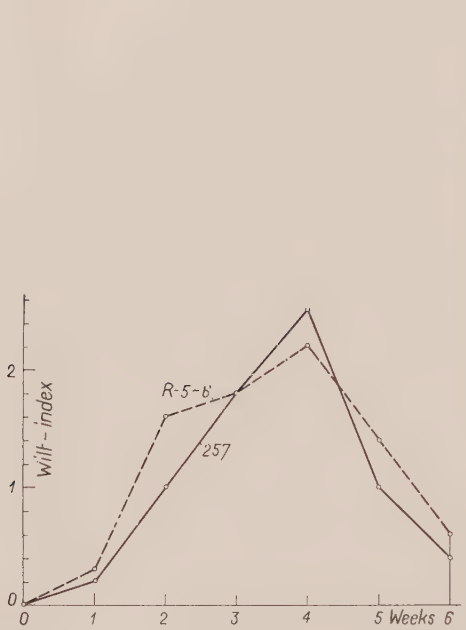

Fig. 5

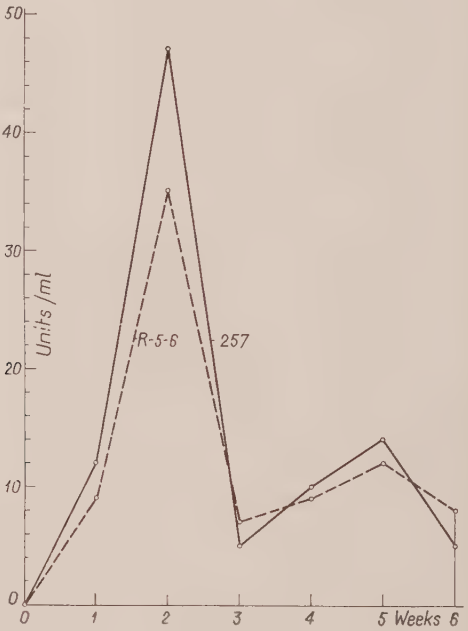

Fig. 6

Fig. 5. Wilt-index of the culture filtrates (concentration 1/5, dose 0.25 ml. per gm. plant material) of strain R-5-6 and 257 of *F. lycopersici*, grown in glycine medium
Fig. 6. *Ustilago* activity of the culture filtrates (in dilution units) of strain R-5-6 and 257 of *F. lycopersici* grown in glycine medium

duction. Thus, the virulent strain may be able to produce more toxin in the tomato plants with the resulting severity of disease as contrasted with the less virulent strains. No doubt there are many other factors in operation apart from the toxin factor in the production of the overall disease picture in the tomato plants by the different strains of the pathogen. Resistance of the host is one such factor. This resistance may manifest itself in two ways. 1. Resistance to the spread of the pathogen and 2. resistance to the toxins produced by the pathogen (GÄUMANN, 1951 b; ZÄHNER, 1955). Disease in the tomato plant results only when both these obstacles have been overcome by the pathogen. Strain 257, although capable of producing some quantity of toxins cannot do so in the plants, because it cannot overcome even the

preliminary resistance of the host to the spread of the pathogen. Thus, it remains localized at the focus of infection, and since no growth occurs, toxins too are not produced in significant quantities.

The fact that *F. lycopersici* can produce its toxins from certain amino-acids (in this case glycine) as the exclusive carbon source is significant. This would mean that in the absence of optimal quantities of sugars in the host, the pathogen would be able to metabolise other constituents, like amino-acids, for toxin production in vivo. If we compare figures 3 and 6 we see that the *Ustilago* activity of the glycine medium is far greater than Richard's medium, specially during the first two weeks. Among the known toxins of *F. lycopersici* only fusaric acid inhibts germination of *Ustilago* spores. In other words, with glycine as the exclusive carbon source, more fusaric acid is produced by the two strains of *F. lycopersici* than with glucose as the carbon source. Although not exactly ascertained, it might be mentioned in the passing, that the growth of the strains in glycine medium is approximately 1/5 less than in glucose medium, and still more fusaric acid is produced in the former medium. This is in keeping with the observations of other authors (KERN, 1952).

The preferential production of fusaric acid, as assessed by the *Ustilago* spore germination tests, in the glycine medium by the strains of *F. lycopersici* led us to think that glycine itself might serve as a distant precursor of fusaric acid. If this were true, we would expect increased fusaric acid production in RICHARD's medium containing small quantities of glycine. Accordingly, the following three media were prepared and both the strains of *F. lycopersici* were cultured in them:

a) Richard's medium + 0.3 % glycine,
b) Richard's medium + 0.15 % glycine,
c) Richard's medium alone as control.

The culture filtrates were assayed as usual with *Ustilago* spore germination tests after each 7 days interval. The results are given in figure 7.

The following facts are borne out from the figures:

a) In all media, fusaric acid production by strain R-5-6 is uniformly lower than strain 257.

b) With increasing quantities of glycine in the medium, a corresponding increase in the production of fusaric acid takes place, especially at the end of 14 days.

We are naturally tempted to interpret these results as evidence for the fact that glycine, either directly or indirectly serves as a precursor of fusaric acid. The facts, however, are not so simple. It is equally possible that glycine causes, by its presence, a more efficient uptake and metabolism of the immediate precursor of fusaric acid. In keeping with this possibility, we observe that there is no significant difference in fusaric acid production at the end of a 7 day period in media with or without glycine. Only between

the 7th. and the 14th. day does the difference become visible. This might again be due to the fact that the enzyme systems, responsible for the metabolism of fusaric acid, are first produced after some days growth.

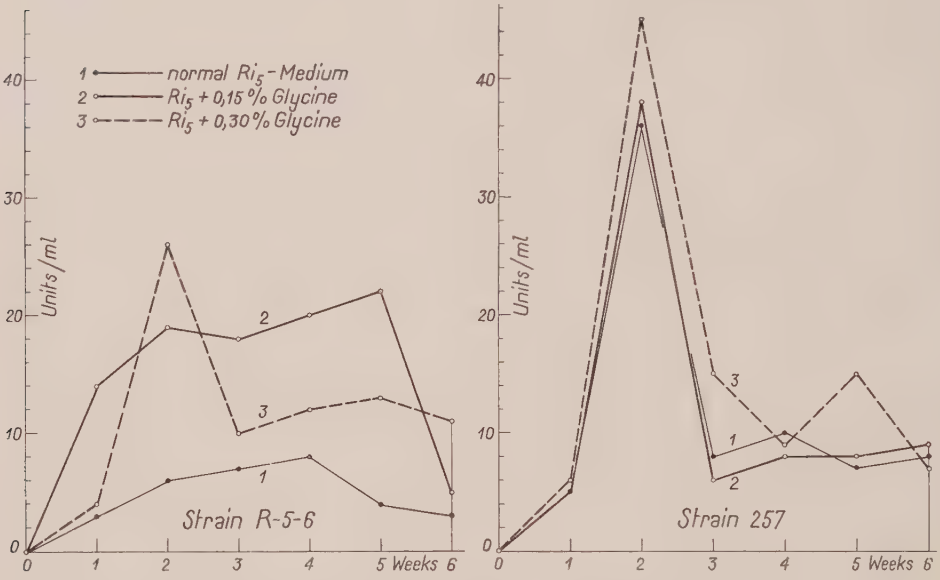

Fig. 7. *Ustilago* activity of the culture filtrates (in dilution units) of strains R-5-6 and 257 grown in Ri_5 medium with different concentrations of glycine

II. Chemical changes in artificial cultures during fusaric acid production

To come closer to an understanding of toxin production in vitro it was necessary to investigate the series of events that lead to the production and accumulation of the toxins in artificial cultures. Facts gathered here could be of use for us in interpreting the toxin production in vivo. In the experiments that follow, we have restricted ourselves to a study of the biosynthesis of fusaric acid alone. The reasons are obvious. For lycomarasmin and vasinfuscarin, there do not exist any chemical methods of determination. Only very recently methods have been developed for the chromatographic determination of lycomarasmin (KERN and FLÜCK, unpublished). Fusaric acid, however, lends itself well to experimentation and methods for its determination are known (ZÄHNER, 1954).

Fusaric acid is a 5 n-butylpyridine-2-carboxylic acid and has carbon, nitrogen, oxygen, and hydrogen in its molecule. In its biosynthesis, therefore, the carbon and nitrogen containing constituents of the medium must have a central role to play. In our preliminary experiments we found out that the common organic acids, resulting from the dissimilation of glucose and accumulating as the same time as fusaric acid in the medium, bear no relationship to fusaric acid production. Their study was, therefore, not taken

up further. The nitrogen containing constituents, however, appeared to have a much closer relationship to the biosynthesis of fusaric acid. In the following study, therefore, the metabolism of nitrate, ammonia, amino-acids, purines and glucose has been studied in relation to fusaric acid production.

Only strain 257 was used and was grown in 500 ml. Erlenmeyer flasks containing 100 of modified Richard's meding (page 336). Analysis of the culture filtrates was done every third day till 42 days. To obtain reliable results and to minimise errors due to natural fluctuations in the metabolism of individual cultures, contents of 10 flasks each time were taken for analysis. In calculating results, corrections incidental to the loss by evaporation were applied. The following constituents were analysed in the culture filtrates: 1. Dry weight of the mycelium 2. Glucose (as reducing sugar). 3. Total nitrogen 4. Nitrate nitrogen 5. Ammonia nitrogen 6. Amino-nitrogen 7. Purine nitrogen and 8. Fusaric acid nitrogen. The methods of analysis have been given earlier (section B, III). The results of this investigation are represented in figures 8, 9 and 10.

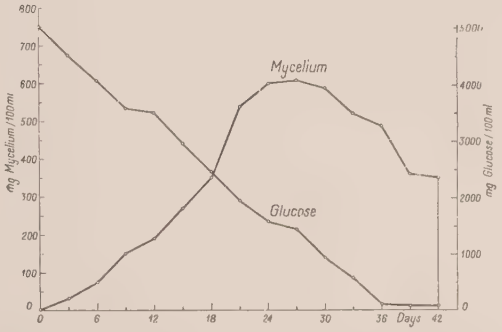

Fig. 8. Dry weight of mycelium and glucose content of the culture filtrates

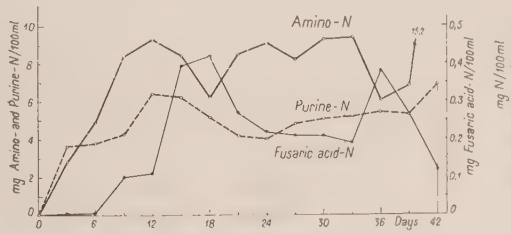

Fig. 9. Amino-N and purine-N in relation to fusaric acid nitrogen in the culture filtrates

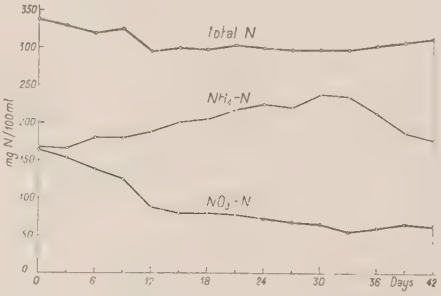

Fig. 10. The relationship between total nitrogen, ammonium nitrogen and nitrate nitrogen in culture filtrates

The following facts can be summarized from a study of figures 8, 9 and 10:

a) The dry weight of the mycelium increases steadily till the 25th. day of growth and then gradually falls down. At about the time the mycelium has reached the maximum growth limit, very little glucose is present in the medium. The increase in the weight of the mycelium is proportional to the quantity of sugar consumed.

b) Fusaric acid first appears in the medium after 6 days of growth and thence afterwards steadily increases till the 18th. day, when it reaches its maximum peak. At the end of this period, the level of fusaric acid production again falls down till the 33rd. day and again rises to a maximum at the end of 36 days.

c) The amino-acids are produced in the medium from the beginning of growth period, reach a peak at the end of 12 days and except for a decrease in production between 12th. to 21st. day and again between 33rd. and 39th. day, are always present at the peak level. Towards the end of the growth period of the mycelium, free amino-acids rapidly increase in the medium. This may be due to the hydrolysis of the cell proteins, once lysis has started.

d) Purines increase in the medium till the 12th. day (at about the same time as the amino acid production reaches its peak), after which the level of production falls down, corresponding to the amino-acid level, and then remains more or less constant. The production of purines corresponds to the amino-acid production in the medium.

e) It will be recalled that RICHARD's medium contains ammonium nitrate as the source of nitrogen. Figure 10 shows that the organism utilizes nitrate nitrogen in preference to ammonia nitrogen. In fact, ammonia increases steadily in the medium till the end of the growth period. On the contrary, nitrates are rapidly taken up. Some of the excess ammonia may accumulate in the medium due to deamination of some of the amino-acids. These findings are in conformity with the earlier work of LUZ (1934). The rise in the pH of the medium (page 348) is perhaps correlated to the accumulation of ammonia.

The total nitrogen of the culture filtrate decreases with active growth of the mycelium but this occurs very gradually.

The significance of these results is obvious. It can be said with very great deal of certainty that fusaric acid is not an autolysis product. Thus, at the time greatest quantity of fusaric acid is available in the medium, the mycelium is still in the log phase of growth. This observation is in contradiction to that observed in *Gibberella fujikuroi* (STOLL, 1954), causing Bakanae-disease of rice in Japan, where maximum quantity of fusaric acid is present when a lysis of the mycelium has already set in. The results with *F. lycopersici* correspond to earlier investigations with the aid of biological tests (KERN, 1952).

The most interesting point, however, is the relationship between amino-acids, purines and fusaric acid (figure 9). The production of purines in the medium parallels amino-acid production. The amino-acids, however, rapidly increase till the 12th. day, when fusaric acid production is the lowest. From 12th. to 18th. day, when fusaric acid production rapidly increases, the amino-acid production decreases. Precisely the same set of events occur between 33rd. and 39th. day. It seems plausible that fusaric acid is produced at the

cost of some of the amino-acids and, therefore, when more fusaric acid is produced, corresponding amounts of amino-acids decrease in the medium. Recent paper chromatographic studies of amino-acid metabolism of *F. lycopersici* (Flück and Richle, 1955) lead to the conclusion that in particular Alanin and Citrullin might be involved in the biosynthesis of fusaric acid.

D. Studies on the metabolism of *F. lycopersici* in vivo

It has been shown in the previous section that *F. lycopersici* produces the three known toxins (lycomarasmin, fusaric acid and vasinfuscarin) both on a glucose and glycine medium. It has been assumed by us, in view of the indirect evidences, that these toxins are also produced by the pathogen in vivo. The direct demonstration of these toxins and other metabolic products of the pathogen in vivo is difficult with ordinary chemical techniques. The only way we could demonstrate the metabolic products of the pathogen in the host would be by certain differential techniques, where we would be able to recognize apart the substances secreted by the pathogen from those of the host. The only possibility that suggested itself was the 'tagging' of the pathogen with a suitable radioisotope.

In phytopathological literature as yet only a few organisms have been effectively employed for tagging. The earliest work has been that of Warren (1951) who was able to tag *Bacterium stewartii* effectively with P^{32} and could trace the distribution of the tagged organism in the corn plant by means of radioautographs. Fitzgerald et al (1951) working with Yeasts showed that it could be tagged by Tritium at a concentration of 100 μC/ml. At this level of radioactivity, the organism was not damaged as assessed by the retention of the budding capacity of the tagged cells. Wheeler (1952, 1953) using C^{14}-labeled glucose was able to tag effectively 5 different fungi at a concentration of 30 μC/ml. He observed that at this level of radioactivity some of the conidia were rendered inviable but the fungi did not lose their virulence. In a later work, using *Helminthosporium victoriae*, he demonstrated that about 100 μC/ml. of C^{14}-labeled glucose could be used safely, without the organism losing its virulence. At this level of radioactivity, however, a number of cells became inviable. Hoffmann and Zuckerman (1954) succeeded in tagging *Endoconidiophora fagacearum* by incorporating in the growth medium C^{14}-labeled sucrose at a concentration of 25 μC/ml. At this concentration the fungal cells did not suffer any damage.

For our experiments, radioactive glycine, labeled in the methyl carbon was used. The specific activity of the glycine was 14.9 microcurie per milligram.

The experimental procedure and details of preliminary work have already been described (Kern and Sanwal, 1954) and may be refered to for further information.

I. The secretion of radioactive metabolic products into the host

Previous experiments have shown (KERN and SANWAL, 1954) that the mycelium can be safely tagged with radioactive glycine at a concentration of 90 μC/ml., after a growth period of 7—12 days. In this case, although about 40 % of the cells become non-viable, yet the organism does not lose its virulence and no difference in the morphology of the fungus can be discerned. It was safe to assume, therefore, that tagged mycelium introduced in the host could be used to find out whether tagged products of metabolism of the pathogen are produced in the plants. This could be investigated both by the counting techniques as well as radioautography of the tissues showing disease symptoms.

In the following experiments, the inoculum was obtained by growing strain R-5-6 in glycine medium having a specific radioactivity of 90 μC/ml., for eight days. The inoculum was washed after this preliminary period of growth with 5 changes of 2 % sterile, inactive glycine solution and further few changes of sterile distilled water in a centrifuge. Tomato plants were inoculated with this mycelium as usual. After every 24 hour period from the time of inoculation, one plant at a time was cut into convenient pieces, about 2 cms. long. The leaves with their petioles were treated separately. Each two centimeter length of the stem was then surface sterilized by means of 0.2 % $HgCl_2$, washed with sterile distilled water and by means of a sterilized knife cut into smaller bits. Pieces of each stem part were laid on poured petri dishes and incubated at 27 ° C for two days. Those stems, in which the fungus appeared were not counted further. In the case of leaves, only the petiole parts attached to the stem were taken and if this showed the presence of the mycelium, the whole leaf was rejected. The tested pieces of each part of the stem were then gathered together, dried and counted.

In the case of strain R-5-6, no radioactivity was detected in plants after 24 hours of infection, but after 48 hours radioactivity was apparent in stems about 13—15 cms. from the base of the stem. Growth of the mycelium at this moment was restricted to areas adjoining the roots. Subsequent measurements at 24 hours interval for a 7 day period showed that radioactivity indeed increased in the leaves, but comparatively much more remained in the stems.

Under our green-house conditions (temp. 24—30 ° C) the vein-clearing symptoms first described by FOSTER (1946) appeared on the host leaves on the 4th or the 5th day. However, all the leaves of the plant did not show this symptom. If this vein-clearing symptom was the result of some translocable toxins secreted by the pathogen in advance of its growth, it was logical to assume that radioactivity would increase considerably in the leaves showing this symptom. This would only be the case, however, if the metabolic products responsible for the vein-clearing were radioactive. That such is the probable case is strongly supported by the analysis presented in table 1.

Here, individual leaves showing vein-clearing symptoms on the plant and those showing no symptoms at all were cut off and their radioactivity

measured. It will be seen from the table that except in a few cases the leaves showing vein-clearing show a relatively greater accumulation of radioactivity from the leaves showing no other symptom. In both the cases no mycelium was present in the leaves.

Table 1

The relative accumulation of radioactivity in different leaves of individual plants (showing vein-clearing or no symptoms at all) after 5 days inoculation with tagged strain R-5-6 of *Fusarium lycopersici*

Plant no.	Counts/mt./mg. (dry weight) of leaves showing vein-clearing					Counts/mt./mg. (dry weight) of leaves showing no vein-clearing				
	Leaf number					Leaf number				
	1	2	3	4	average counts/ mt./mg.	1	2	3	4	average counts/ mt./mg.
	890	430	426	710	614	136	174	282	102	148
	646	846	314	391	549	89	194	124	267	171
	428	542	894	334	550	117	215	97	99	132
	371	420	220	227	310	98	115	204	123	135
	1650	929	543	385	877	231	72	53	174	133

The difference in the radioactivity of the injured and the healthy laeves on the same plant, leads us to believe that the pathogen secretes some substances of toxic nature into the host which are carried up to the leaves and cause the characteristic symptoms there. These findings are substantially in agreement to those of Davis (1954) who reached the same conclusion through different experimental procedures.

In the case of strain 257 (avirulent), the vein-clearing symptoms do not appear at all, at least under our greenhouse conditions. It was interesting to find out whether, in the absence of immediate symptoms on the host, the fungus builds up or secretes some substances in the host.

The answer to this question was obtained by growing strain 257 in the radioactive glycine medium for 8 days and inoculating the plants with the usual techniques. Analysis of such plants showed that, in contrast to strain R-5-6 radioactivity accumulates very slowly in the leaves and very little is present in the stems.

At the first sight the results of these experiments with virulent and avirulent pathogens seem contradictory. Both appear to secrete certain chemical substances in the host plant and yet one strain can produce disease in the plant and the other not. To the author, it appeared, as a reconciliation between these two apparently contradictory facts, that there is a qualitative difference in the secretion of chemical substances by these two kinds of strains inside the host; the avirulent pathogen secreting certain substances which are not toxic to the plants and the virulent one certain substances which are toxic along with others which are non-toxic.

The verification of this hypothesis is beset, unfortunately, with difficulties and complications. It would be an exacting task to purify all the plant constituents separately for radioactive measurement.

II. The distribution of radioactive metabolic products in the host tissue

Until now, in our analysis, we have included all the tissues of the host, irrespective of the fact that within the same tissue only certain parts show the symptoms. Thus, in leaves showing vein-clearing symptoms, only the veins of the leaves show the disease and not the intervenal spaces. In stems, similarly, the vascular bundles show the browning and the rest of the tissue seems perfectly healthy. If we carry our argument, that at least some of the symptoms on the host are due to toxic metabolic products of the pathogen further we should be able to demonstrate comparatively more radioactivity in the strictly diseased portions than from the surrounding healthy areas (in our examples, more in the veins than in the intervenal portions or in the case of stems, more in the vascular bundles than in the ground tissue). Since mechanical teasing of the tissues apart from one another would introduce considerable amount of inaccuracy, we took recourse to the radioautographic techniques.

The tomato plants, at the four leaf stage, were inoculated with tagged R-5-6 and 257 strains. After 12 days infection period, the stems of the plants inoculated with strain R-5-6 showed a typical browning of the vessels about 8—10 cms. above ground level and vein-clearing on the older leaves. The plants inoculated with strain 257, at about the same time, showed slight browning of the vessels only about 0.5—1 cm. above the ground level and no vein-clearing symptoms on the leaves. For radioautography, we only took the following parts from the plants:

1. Stem portions showing browning.
2. Stem portions showing no browning.

The diseased and healthy leaves were not included here, because the radioactivity in the leaves was very much less than that required for obtaining a satisfactory image on the emulsion (see KAMEN, 1951; SANWAL, 1955). Convenient pieces of each one of the above tissues were prepared for sectioning in the following ways:

1. The tissues were placed in water and air was removed from them by a water suction pump. The objects were tranferred then to a vessel containing ethylene glycol cooled to — 20 ° C (see for further details, TIETZ, 1952, 1953). After allowing them to remain there for 3 hours, the contents of the vessel were gradually warmed to room temperature and the tissues transferred to a 1 : 1 mixture of ethylene glycol and Aquaffin*) (manu-

*) For kindly lending me a sample of this wax, I thank Dr. H. F. LINSKENS of Köln University, Germany, who also was kind enough to call my attention to some of the published literature on the use of synthetic waxes in histology.

factured by BAYER Farbenfabriken, Leverkusen) for a short time at 30° C and then 2 hours at 50° C. Next they were placed in pure Aquaffin for 6 hours and embedded in the same material for sectioning. Sections about 7 μ thick were cut and stretched on specially prepared microscope slides (see section B, IV). Before radioautography the wax was removed from the slides by laying on top of the sections a filter paper soaked in a mixture of Aquaffin (10 %) and water saturated with Thymol and allowing it to dry. The sections were then covered with the 'stripping' film emulsion and exposed for 40 days.

Fig. 11. Radioautograph (on NTB emulsion) of a transverse section of tomato stem showing vascular browning (plants inoculated with t a g g e d strain R-5-6 of *F. lycopersici* and tissues fixed in methanol) × 67

2. The tissues were fixed for 12 hours in methanol, dehydrated, passed through various grades of xylol and embedded in paraffin. Sections, about 7—10 μ thick were exposed on NTB plates for 40 days.

Both the above written methods were used, because we did not know whether the metabolic products were water insoluble or alcohol insoluble. The first method would preserve water insoluble metabolic products and the latter alcohol insoluble ones.

Controls were employed for all the series of sections.

Results of this work are summarised below:

a) Only those sections of diseased stems show significant amount of radioactivity which had been fixed in methanol (figs. 11 and 12); those fixed with the other methods showed very little, if at all (optical density of the developed silver grains less than D = 0.5). This might be due to the fact that the metabolic product associated with the diseased vascular bundles were water soluble, so that, during fixing procedures, most of the radioactivity leached out from the material.

b) Sections of diseased stems (showing vascular browning), obtained either from the plants infected with strain R-5-6 or 257, show radioactivity only in the vascular tissue, after having been fixed in methanol (figs. 11 and 12).

c) Sections of normal stems (showing no vascular browning) show no detectable radioactivity in any part. This is uniformly so, whether the stems used are from plants infected with either of the two strains or the different fixing procedures.

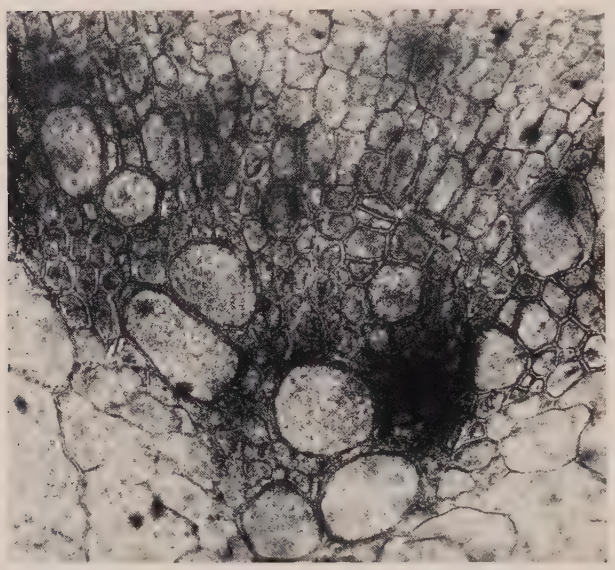

Fig. 12. Radioautograph same as figure 11. One of the vascular bundles enlarged to show the developed silver grains directly above the xylem cells. Note that no mycelium is present in the vessels and no radioactivity in the ground parenchyma cells. × 270

d) In the case of diseased stems, inoculated with marked R-5-6 strain, radioactivity is detectable in the vessels independent of the presence of the radioactive mycelium (fig. 12), when the stems are fixed in methanol.

e) The control preparations, given the same treatment as the others above, did not affect the emulsion, thereby showing (fig. 13) that the other exposed pictures were not artefacts.

From all the observations above recorded, some significant facts can be deduced. Firstly, the pathogen during its growth in the host secretes certain metabolic substances, some of which at least are toxic to the plants. This is borne out by the fact that radioactivity in the stems is closely associated only with the diseased portions. Secondly, this metabolic product seems to be water soluble and alcohol insoluble (precipitable by methanol) and possibly, therefore, is of a proteinaceous nature. Vasinfuscarin, produced by *F. lycopersici* in vitro is similarly precipitable by methanol (GÄUMANN, STOLL and KERN, 1953). It cannot be said at this stage of work whether the precipitable substance in vitro and in vivo is one and the same, but there is evidence that such might be the case.

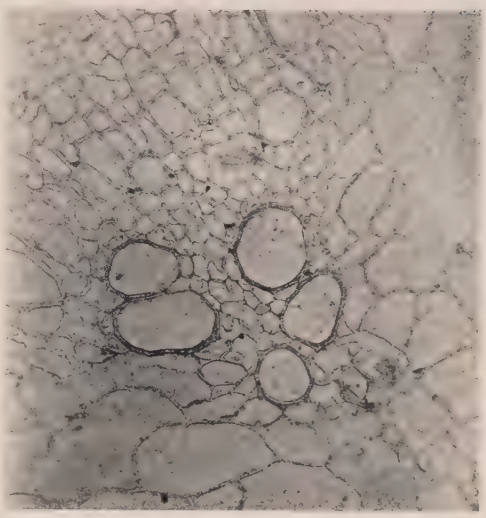

Fig. 13. Controls (on NTB emulsion) of a transverse section of tomato stem showing vascular browning (plants inoculated with non-radioactive strain R-5-6 of *F. lycopersici* and tissues fixed in methanol). × 165

III. Chemical substances secreted by the pathogen in the host

Elsewhere in this work, it has been demonstrated that when plants are inoculated with tagged mycelium, radioactivity is discernible in both stems and leaves of the infected plants after some time. This was irrespective of whether the inoculation was done by the virulent or the avirulent strain. The explanation given was that the metabolic products secreted by both the strains varied qualitatively from one another, i. e., the avirulent pathogen perhaps secreted certain substances which were non-toxic and the virulent pathogen substances which were both toxic and non-toxic. As we have shown with radioautographic techniques, the avirulent pathogen also secretes certain radioactive, seemingly toxic metabolic products, but they are limited to the area of infection (at the base of the plants, small portions showing vascular browning).

Incidental to the above hypothesis, the following two questions were taken up as basis for further experimentation:

1. What kinds of metabolic substances are produced by the pathogen in vivo?

2. Is there any difference, qualitative or quantitative, in the secretions of the virulent and avirulent pathogens?

The answer to these questions was given by extraction and chemical analysis of the infected plants. It must be emphasized from the very beginning that only a gross and rough characterization of the radioactive substances secreted by the pathogen could be had because of the technical difficulties involved in the work.

15 tomato plants were inoculated each by marked strains R-5-6 and 257 (tagged with 2-C^{14}-glycine at a concentration of 90 μC/ml.). After about 15 days growth (when many plants showed wilting symptoms and necrosis etc.) the plants were cut off from the soil level and divided into

Table 2

The distribution of radioactivity in fractions of stem and leaf tissue 15 days after inoculation with tagged strain R-5-6 of *Fusarium lycopersici*

Extract	Stem fraction (dry weight 7.9 g.) total activity = 129 162 counts per minute		Leaf fraction (dry weight 9.8 g.) total activity = 78 075 counts per minute	
	counts/mt.	percentage of total activity	counts/mt.	percentage of total activity
Petroleum ether extract				
acidic part	1 033	0.8	468	0.6
non-acidic part	1 162	0.9	390	0.5
Ether extract				
acidic part	17 308	13.4	9 787	12.6
non-acidic part	267	0.2	2 185	2.8
Ethanol extract				
acidic part	4 918	3.8	4 740	6.2
non-acidic part	12 141	9.4	5 233	6.7
70% ethanol extract				
amino-acids	12 014	9.3	10 306	13.2
acidic subs.	0	0	lost	lost
basic subs.	1 034	0.8	1 952	2.5
sugars etc.	10 849	8.4	11 399	14.6
Proteins	42 494	32.9	12 726	16.3
Tannins & gums	0	0	78	0.1
Dextrins & pectins	904	0.7	1 405	1.8
Starch and cell wall constituents	16 791	13.0	8 120	10.4
Total recovered	118 905	92.5	68 670	88.3

stems and leaves. The two sets of plants (one set inoculated with R-5-6 and the other by 257) were handled separately. Each of these portions was dried by a forced draft and weighed. The tissues were then ground mechanically and aliquots of material counted with a GM counter to obtain the total radioactivity of the tissues.

The ground up tissues were extracted (see also, WEINTRAUB et al, 1952 a, 1952 b) exhaustively with petroleum ether for 12 hours, after which it was poured off. The solid tissues were then extracted in turn for 12 hours with ethyl ether, 12 hours with absolute ethanol and finally 12 hours with 70 % aqueous ethanol. Each time the liquid was poured off and kept for a subsequent analysis. The residue was then extracted first with cold water and then with hot water by turns. In the end the residue consisted of starch and cell wall material.

The petroleum ether and ethyl ether extracts each were shaken with equal volume of sodium bicarbonate solution in a separating funnel and the bicarbonate layer separated from ether. It contained the acidic fraction and ether,

Table 3

The distribution of radioactivity in fractions of stem and leaf tissue 15 days after inoculation with tagged strain 257 of *Fusarium lycopersici*

Extract	Stem fraction (dry weight 12.3 g.) total activity = 85 605 counts per minute		Leaf fraction (dry weight 14.1 g.) total activity = 111 234 counts per minute	
	counts/mt.	percentage of total activity	counts/mt.	percentage of total activity
Petroleum ether extract				
acidic part	1 969	2.3	1 223	1.1
non-acidic part	257	0.3	556	1.5
Ether extract				
acidic part	759	0.7	2 002	1.8
non-acidic part	7 276	8.5	3 782	3.4
Ethanol extract				
acidic part	2 824	3.3	2 113	1.9
non-acidic part	4 879	5.7	1 446	1.3
70% ethanol extract				
amino-acids	13 097	15.3	11 522	10.7
acidic subs.	1 027	1.2	1 445	1.3
basic subs.	2 654	3.1	4 136	3.7
sugars etc.	12 583	14.7	12 903	11.6
Proteins	7 276	8.5	12 013	10.8
Tannins & gums	1 027	1.2	2 558	2.3
Dextrins & pectins	3 938	4.6	1 557	1.4
Starch and cell wall constituents	15 922	18.6	22 469	20.2
Total recovered	75 488	88.0	79 725	73.0

the nonacidic fractions. The absolute ethanol extract was evaporated under vacuum and the residue was taken up in water. The pH of this solution was brought to 3.5—4.0 and it was then extracted with ethyl ether to remove the acidic constituents. The water phase, after extraction contained the non-acidic constituents. From the 70 % ethanol extract, ethanol was removed under vacuum and the water solution was boiled for some minutes to remove proteins which were separated by centrifugation. The supernatant was brought to a pH of about 8.0 with alkali and extracted with ether to remove the basic substances. The extract remaining after ether extraction was adjusted again to a pH of 4.8—5.2 and treated with neutral lead acetate to precipitate amino-acids. The precipitated amino-acids were removed by centrifugation. The supernatant contained sugars etc.

The cold water extract was boiled for 10 minutes and the precipitated protein was centrifuged out. The supernatant was adjusted to a pH of 4.8—5.2 and neutral lead acetate was added to it. The precipitate consisted of tannins and gums and the supernatant of dextrins and pectins.

The hot water extract was boiled to remove all traces of proteins. The solution was then treated with neutral lead acetate to remove gums and tannins.

Each of the above fractions was counted as usual with a GM counter. Tables 2 and 3 summarize the results of this investigation.

The results obtained above show that both the virulent and avirulent strains secrete varied kinds of chemical substances in the hosts. It cannot be said for certain whether these chemical substances remain in the original form, as secreted by the pathogens in the host, or are broken down and modified further by the host enzyme systems. The salient features of the investigation can be summarized as follows:

a) The pathogen secretes a wide variety of chemical substances in the host, some of which are undoubtedly non-toxic.

b) The principle substances secreted by the pathogen are certain acidic substances, amino-acids, sugars and proteins.

c) The main difference in the secretions of virulent and avirulent pathogens is probably the protein substances; the virulent pathogen secretes more substances of protein nature than the avirulent pathogen.

It must be borne in mind that the radioactive chemical substances, shown to be secreted by the pathogens are not the only ones. Perhaps more important are the substances elaborated by the pathogen in the host plant by transformation of the host nutrients through its enzymatic system. Thus, many important toxic substances, known to be produced by the pathogen in vitro probably cannot be demonstrated by our techniques in vivo because they may be elaborated by the breakdown of the host nutrients.

Apart from the above, our experiments have demonstrated that there are definitely some substances secreted by the pathogens which are toxic, like perhaps the metabolic product causing the vein-clearing symptoms and the browning of the vessels.

E. The role and fate of C^{14}-marked fusaric acid in tomato plants

By the tagging techniques, described in previous sections, only those toxic components can be demonstrated in vivo which are elaborated in the mycelium and secreted to the outside, i. e., the intracellular toxins. On the contrary, extracellular toxins are elaborated by the pathogen by transformation of the host nutrients only external to the mycelium. Fusaric acid is an example of an extracellular toxin and vasinfuscarin that of an intracellular one. The terms intracellular and extracellular are here used in preference to endotoxin and exotoxin respectively, because by usage with bacterial organisms, the term endotoxins has come to signify

those toxic substances which are released after the death of the cells. Exotoxins, on the contrary, are produced by the living bacteria inside the cells and then secreted to the outside (BURROWS, 1951).

It is relatively simple to distinguish between intracellular and extracellular toxins in fungi. When young, actively metabolizing mycelium of *F. lycopersici* is suspended in replacement cultures, even for a short time, the intracellular toxin vasinfuscarin is secreted in the culture medium. Alternatively, when the mycelium is disintegrated by mechanical means and extracted with water, only the presence of vasinfuscarin can be demonstrated. Using similar techniques, fusaric acid, one of the extracellular toxins, cannot be detected inside the mycelium*); it is only present in the culture filtrates. This is because of the fact that fusaric acid is only produced external to the mycelium during the course of growth and metabolism in vitro. There was no reason to doubt that fusaric acid would similarly be produced in vivo by the metabolism of the host nutrients through the enzyme systems of the pathogen. For these reasons, therefore, it was never expected that fusaric acid would be demonstrated in diseased plants by the tagging techniques. However, sufficiently sensitive methods are known for the detection of fusaric acid (ZÄHNER, 1954). Accordingly, a number of efforts were made to extract fusaric acid from the diseased plants, but they were in vain. It was doubted, therefore, that fusaric acid is metabolised by the host as soon as it is formed by the pathogen. Evidence for this possibility exists from the work of Japanese authors (TAMARI and KAJI, 1952 a, 1952 b). The following work was undertaken, therefore, to investigate the metabolic fate of fusaric acid in the host and to clarify certain questions incidental to the pH effect of fusaric acid (GÄUMANN, NAEF-ROTH and KOBEL, 1952). The latter investigations shall be published elsewhere.

While the experiments on the distribution of C^{14}-marked fusaric acid were in progress, it was noticed that the total radioactivity in the tissues was very much lower than the radioactivity originally applied, specially after the cuttings had been placed in water for 48 hours after uptake of radioactive fusaric acid. Even after reckoning with the sampling error, the loss of radioactivity from the tissues could not be explained. In case of nicotinic acid, a closely related compound, it is known that it is decarboxylated and metabolized to a number of related compounds in animals (LEIFER, ROTH, HOGNESS and CORSON, 1951). Accordingly, investigations were untertaken to study the metabolism of fusaric acid in plants. The Japanese authors believe (TAMARI and KAJI, 1952 a, 1952 b) that fusaric acid is changed to chelate ring complex in rice plants (see also, DEUEL, 1954). The chelate complexes of fusaric acid are furthermore insoluble in water. The chelate complex may be one of the products of metabolism of fusaric acid, but whether any other products are also formed side by side with this are unknown.

*) For undertaking some of the investigations in this line the writer is grateful to Mr. D. KLÜPFEL.

I. Decarboxylation of C^{14}-marked fusaric acid in plants under different conditions

If fusaric acid is decarboxylated and no other change takes place in the fusaric acid molecule, 3 n-butylpyridine is obtained:

Fusaric acid — 3 n-butylpyridine

If such a series of events occured in the tomato plants, after application of fusaric acid, we would not only get radioactive CO_2 coming out from the plants, but also a product which is more toxic than the fusaric acid itself. The extent of $C^{14}O_2$ evolution by the plants after uptake of the minimal dose of C^{14}-marked fusaric acid had to be known before we started isolating the hypothetical 3 n-butylpyridine from the tissues.

Tomato cuttings were allowed to take up C^{14}-marked fusaric acid (approx. 150 mg./kg. fresh weight, at a concentration of 5.0×10^{-3} molar) under a bell jar provided with a CO_2-free air circulation devise. The CO_2 evolved by the plants was collected in 2 N NaOH. Immediately after the plants had taken up by transpiration pull the required amount of fusaric acid, the cuttings were immersed in a 0.01 M NaH_2PO_4 (WEINTRAUB et al, 1952 a) solution in order to minimize the retention of carbon-dioxide. CO_2 was collected each 24 hour period for 3 days, converted to barium carbonate as described earlier (cf. section B, IV) and counted under a GM counter. The obtained counts were calculated to the activity of 'zero thickness' (page 345).

a) Effect of pH of C^{14}-marked fusaric acid on $C^{14}O_2$ evolution

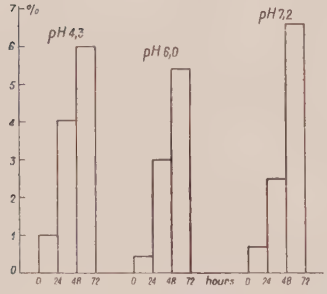

Fig. 14. Decarboxylation of carboxyl marked fusaric acid in tomato plants at different pH values.
Axis: Time in hours.
Ordinate: Percentage of applied radioactivity (as fusaric acid) in $C^{14}O_2$ evolved by the plants

The tomato cuttings of approximately the same age and height were allowed to take up fusaric acid at pH 4.3, 6.0 and 7.2 respectively. In each series, six plants were included and $C^{14}O_2$ was collected for 3 days and analysed at every 24 hours interval. The results are given in figure 14. It will be seen that the carboxyl group of fusaric acid is broken down in the plant cells. At all the three pH values, the $C^{14}O_2$ evolution is at first slow and increases after 24 hours of application. At the end of 72 hours of application approximately 10% of the fusaric acid originally applied is broken down. The pH of the applied fusaric acid seems to play a very minor role in its breakdown by plant cells.

Maximum breakdown within a 72 hour period after application is achieved when the original application was at a pH of 4.3. However, during the course of these experiments it was consistently noted that the amount of decarboxylation of fusaric acid varied very much with individual plants. Even when the plants were of the same age and grown under the same conditions and handled the same way experimentally, a variation of 15—20 % in the results was easily obtained.

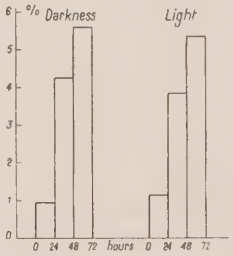

Fig. 15. Decarboxylation of carboxyl marked fusaric acid in tomato plants kept under complete darkness and continous light at pH 4.3.
Axis: Time in hours.
Ordinate: Percentage of applied radioactivity (as fusaric acid) in $C^{14}O_2$ evolved the plants

b) Effect of continuous light and continuous darkness on the breakdown of fusaric acid

As stated earlier, the experiments above reported were conducted under continuous light. Since light has an important bearing on the CO_2 exchange in the plants, it might indirectly affect the breakdown of fusaric acid. The entire experimental set up was the same as above, except that the bell jar containing the plants was wrapped up on all sides with black paper. Figure 15 represents the results of this investigation. It will be seen from the histogram, that within the limits of the experimental error, the $C^{14}O_2$ evolved by the plants after uptake of C^{14}-marked fusaric acid at a pH of 4.3 is about the same in light as well as in darkness. Light or darkness has, therefore, no effect on the decarboxylation of the fusaric acid molecule.

II. The intermediate products of metabolism of fusaric acid

One of the ways to understand the mechanism of action of a toxin is to find out how it is catabolized by the plants. In general, a toxin can affect the plant cells in two ways: 1. As the original molecule, e. g., by permeability distortions, coagulation of the protoplasm and so on and 2. by getting changed in tissues to substances which in their turn are more toxic to the plant cells. It is also possible that both these mechanisms simultaneously operate in causing injury to the plant cells. With reference to plant toxins, e. g., lycomarasmin, much evidence exists that they affect the plant cells mainly as chelate complexes (Gäumann and Naef-Roth, 1954 a, 1954 b; Deuel, 1954). The fusaric acid molecule also possesses a great chelating power (Tamari and Kaji, 1952 a, 1952 b) and naturally, a possibility exists that it is chelated in the plants with the various metal ions.

Besides the mode of action of toxins on plant cells, it is interesting to find out how the plant cells defend themselves, chemically speaking, against the action of the toxins. We know a good deal about the morphological

defence mechanisms in the plants against the invasion by the parasite and its toxins (GÄUMANN, 1951 b), but we have no such knowledge regarding the chemical defence mechanisms against the penetrating toxins. One way of defence would be by detoxicating the toxins through conjugation reactions or through the action of enzymes. In animal cells, for instance, many mechanisms of detoxication are known (WILLIAMS, 1947). To give but one example, the ingested pyridine ring (along with the derivatives of pyridine) undergoes methylation in animal body and is rendered harmless. Thus nicotinic acid or nicotinamide, once introduced in the animal body undergoes transformation to N'-methylnicotinamide and trigonelline (N'-methylnicotinic acid). Again, in dogs injected pyridine, a highly toxic compound, undergoes similar methylation and in this way is excreted out of the body in a harmless form. Although not directly demonstrated, a similar possibility perhaps also exists for α-picolinic acid. In certain mussels, like *Arca noae*, homarine (N'-methylpicolinic acid) is regularly found and this arises perhaps through the methylation of α-picolinic acid. Such mechanisms have, however, not yet been demonstrated in plants, but there is no reason why they should not occur here. The presence of numerous betaines and trigonelline in plants shows that methylation reactions play an important part here as in animals, and we should expect to find in plants also certain detoxication reactions.

To investigate the fate of fusaric acid and numerous other questions raised above, the following procedure was adopted:

4 tomato cuttings (fresh weight, 5.7 gms.), were allowed to take up with the transpiration stream a required dose of C^{14}-marked fusaric acid at a pH of 4.3 (approximately 150 mg./kg. fresh weight). The cuttings were then left in tap water for 48 hours and at the end of this period, ground very thoroughly in a mortar in order to break the plant cells. The ground up material was placed in a percolator and extracted for 24 hours with about 800 ml. 85 % ethanol. The extract was concentrated to about 100 ml. under reduced pressure at room temperature and the solid particles, pigments etc., removed by centrifuging the water extract. Radioactivity was measured in the solid material by oxidizing the samples as described elsewhere. The dirty-white extract was alkalinized with N NaOH and extracted in a Kutscher-Steudel apparatus for 72 hours with ether (refered to further as extract I). The original water extract was then adjusted to a pH of 4.0 with N HCl and again extracted with ether in a Kutscher-Steudel apparatus for 72 hours (refered to as extract II). Extract I, II and the original water extract (extract III) were then evaporated to dryness, oxidized by VAN SLYKE wet oxidation and the radioactivity measured. The results are given in table 4.

It will be seen from table 4 that a large fraction of the applied radioactivity appears in the ethanol extract (54.5 %), but a large amount is also converted into an alcohol-insoluble fraction (28.3 %) which cannot be, therefore, extracted from the plants. That some fusaric acid remains unconverted is also indicated from the above figures. We would expect to recover all the

Table 4

The radioactivity in various fractions of an alcoholic extract of tomato plants which had taken up a minimal dose of C^{14}-marked fusaric acid at a pH of 4.3 (Total radioactivity applied = 73 525 counts/mt. as barium carbonate)

Extract number	Total radioactivity corrected to infinite thickness. Counts/mt.	percentage of applied radioactivity
Tissues after extraction	20 808	28.3
Pigments and small solids after removal of ethanol	312	0.4
Extract I	5 367	7.3
Extract II	24 851	33.8
Extract III	9 852	13.4
Percentage of total radioactivity recovered	61 190	83.2

unchanged fusaric acid, if any present, in extract II, and as the results show, this fraction shows the greatest activity. The basic and neutral substances (extract I and III) also contain a small amount of radioactivity. It is thus clear from the table, that after 48 hours of application, the fusaric acid is metabolized by the plants and converted into different metabolic products.

It will be seen (table 4) that only 82.2 % of the radioactivity originally applied is recovered by our methods. A part of the applied radioactivity no doubt escapes as $C^{14}O_2$ and the rest may be due to sampling and experimental errors. The results given in the table are roughly quantitative because the fractionation procedures involve a certain amount of error.

The next step in the above investigation was naturally to identify the various products of metabolism. Since the isolation of the metabolic products of fusaric acid involved highly empirical procedures, we took recourse to the following method for a rough identification:

Three tomato cuttings weighing 4.2 gms. (fresh weight) were allowed to take up 0.6 mg. of C^{14}-marked fusaric acid in a concentration of 5.0×10^{-3} molar at a pH of 5.0. The total radioactivity of the applied fusaric acid was approximately 1.2×10^{6} disintegrations per minute. After 48 hours of application, the plants were gathered together and along with a little sand were thoroughly ground up in a mortar. The whole mass was extracted in a percolator as elsewhere described and the extract divided into basic, acidic and neutral components by alkali partition and extraction with ether. Each of the extracts was concentrated to a volume of 0.5—1.0 ml. (depending upon the radioactivity of the extracts) at room temperature under reduced pressure. Approximately, a total of 0.1 ml. of each of these concentrates was applied on the starting point of Whatman no. 1 chromatographic paper by successively applying each time a 0.001 ml. drop and drying. Components of each one of these three extracts were separated unidimensionally by allowing the chromatogram to run in a

Butanol, acetic acid and water solvent (45 : 5 : 50). After separation, the chromatograms were dried at room temperature for 12 hours and strips of the chromatogram, containing the separated components, scanned with a GM counter (see section B, IV). Figures 16, 17 and 18 represent the radiochromatograms of the separated components of the plant extracts obtained after 48 hours of introduction of radioactive fusaric acid in the tomato cuttings.

It will be seen from the figures, that the acidic ether soluble fraction contains but one radioactive constituent with a R_f of approximately 0.84. This is most probably the unchanged fusaric acid. The neutral extract contains two radioactive constituents with R_f of 0.20—0.22 and 0.51—0.54 respectively, and the basic extract contains only one radioactive spot having a R_f of 0.61—0.63. The small spot with a R_f of 0.21—0.22 on this chromatogram is probably the same as the spot occupying the same position on the chromatogram of neutral constituents of the plant extract.

It is very likely that many more products of fusaric acid metabolism occur in the plant extract, but they are not demonstrable with our techniques. Only those metabolic products of fusaric acid are demonstrable here which still retain the C^{14} of the carboxyl group originally marked in the fusaric acid molecule. We yet do not know how the butyl-chain of the fusaric acid molecule is metabolized.

A further identification of these metabolic products of fusaric acid is difficult. Work in this direction is still being carried on in this Institute and will be reported elsewhere.

Now we can summarise the results of our investigation as follows:

Fusaric acid, after introduction in the tomato plants, is metabolized and probably the following products are formed:

1) Converted into alcohol insoluble fraction in the plants (chelated with metal ions?).

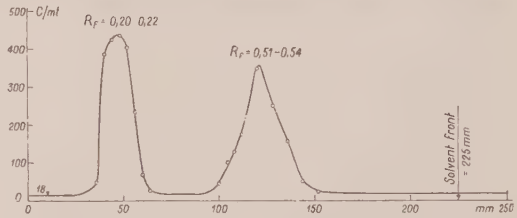

Fig. 16. Radiochromatogram of neutral, water soluble fraction of plant extract

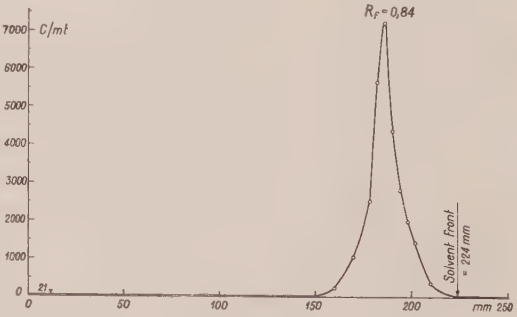

Fig. 17. Radiochromatogram of ether soluble, acidic fraction of plant extract

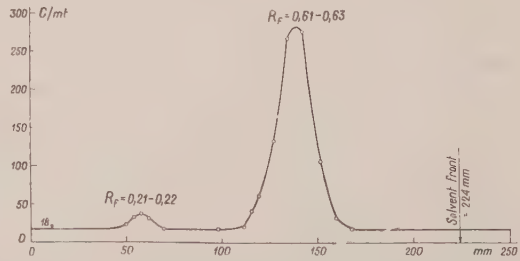

Fig. 18. Radiochromatogram of ether soluble, basic fraction of plant extract

2) Carboxyl group of the molecule broken down with the production of CO_2 and perhaps 3n-butylpyridine (if we assume that the butyl-chain remains intact after decarboxylation).

3) Converted into water soluble, neutral substances with a R_f of 0.20—0.22 and 0.51—0.54 in butanol-acetic acid-water solvent.

4) Converted into very small amount of basic, ether soluble substance with a R_f of 0.61—0.63 in butanol-acetic acid-water solvent.

5) A large amount remains unchanged as fusaric acid. This might represent the excess beyond the quantity of fusaric acid required to cause damage in the plants.

The above is only true for the carboxyl group of the fusaric acid molecule. We yet do not know how the side chain of the molecule is metabolized and what products are formed.

III. Quantitative breakdown of fusaric acid in plants

It has been demonstrated above that some fusaric acid remains unchanged in the plants after uptake of a minimal dose (approx. 150 mg./kg. fresh weight). If fusaric acid affects the plant cells as such, i. e., unchanged, we should expect to recover a major part of the applied fusaric acid from the plants which have been allowed to take up this substance. Pertinent here is also the question that we raised in the introductory part of this problem, viz., if fusaric acid is secreted by the invading pathogen in the host, it may not always be possible to detect it if it is quickly metabolized by the plant cells. According to the working hypothesis we propose for the injurious effect of the fusaric acid is that it is metabolized into some substance which is much more toxic to the plant cells than the original fusaric acid molecule, and this substance is of major importance as regards the production of damage; the remaining fusaric acid, after uptake by the plants, either remains as such or is converted into a number of substances which we have already demonstrated above, and which might be the products of detoxication reactions in the host cells. If our concepts were true, we would recover from the plants only that amount of fusaric acid which represented the excess beyond that required for causing damage. Thus, if we were to give the plants lesser and lesser quantities of fusaric acid, we would expect to recover correspondingly lesser quantities of free fusaric acid till the time a minimum dose is reached, after which no more free fusaric acid could be recovered from the plants after application. That in substance, at least, our hypothesis is valid is shown below.

The quantitative breakdown of fusaric acid in tomato cuttings was investigated by the help of isotope dilution technique (Calvin et al, 1949). The procedure adopted was as follows:

3 tomato cuttings were allowed to take up C^{14}-marked fusaric acid at a concentration of 2.5×10^{-3} molar in the required dose. After 48 hours of uptake, the plants were ground up thoroughly with sand in a mortar.

The material was extracted in a percolator at room temperature with about 800 ml. of 80 % ethanol for approximately 24 hours. The extract so obtained was concentrated to about 100 ml. under reduced pressure at room temperature. The pigments and other solids were removed by filtration. To the water extract was added a known quantity of pure inactive fusaric acid as carrier. The pH of the solution was adjusted to 8.0 and it was extracted with ether in a Kutscher-Steudel apparatus for 72 hours to remove fatty substances, pigments and oils etc., which otherwise interfere in the final crystallization of fusaric acid. The water extract was again adjusted to a pH of 4.0 and extracted with ether for 72 hours. This ether extract was evaporated to dryness under reduced pressure at room temperature. The remaining dry solids were extracted 4 times, each time for two hours with 30 ml. quantities of petroleum ether under a reflux condensor. The petroleum ether extract was again evaporated to dryness under reduced pressure. The remaining solids were then extracted with 40 ml. of boiling Hexan under a reflux condensor for about 1 hour and the fusaric acid crystallized out from this solution at 0 ° C. The fusaric acid crystals so obtained were purified by repeated crystallizations from boiling Hexan till the time constant radioactivity was obtained. This required generally two crystallizations. A further check on the purity of the isolated fusaric acid was made by determination of the melting point. The pure isolated fusaric acid was divided in three lots (each 2—4 mg., depending upon the quantity isolated) and each lot oxidized by the VAN SLYKE wet combustion method and radioactivity determined by counting the barium carbonate samples. A mean of three readings was taken. The amount of fusaric acid isolated from the plants was calculated from the following formula:

$$a = \frac{b}{Z - 1}$$

where a = mg. of C^{14}-marked fusaric acid remaining in the extract (unknown); b = mg. of inactive fusaric acid added as carrier; Z = ratio of the specific activity of C^{14}-marked fusaric acid (counts per minute/mg. of radioactive substance) to the specific activity of the isolated fusaric acid sample (counts per minute/mg. isolated fusaric acid).

Table 5 shows the results of this investigation.

Table 5

The quantity of fusaric acid metabolized by the tomato plants during 48 hours after uptake of a dose of C^{14}-marked fusaric acid

No.	Amount of fusaric acid given per gm. plant material	pH of solution	Amount of inactive fusaric acid added (b)	Ratio of sp. activities (Z)	mg. unchanged fusaric acid/gm. plant (a)	percentage metabolized in plants
1.	0.2454 mg.	6.0	48.8 mg.	199.2	0.0456	81.4 %
2.	0.2432 mg.	4.3	29.7 mg.	73.1	0.0557	77.6 %
3.	0.1207 mg.	4.3	32.9 mg.	671.8	0.0085	93.1 %

Table 5 shows clearly that fusaric acid is quickly metabolized by the plants and at the end of a 48 hour period, only a very small quantity of the applied fusaric acid can be extracted out of the plants. Within the limits of experimental error, the quantity of fusaric acid broken down is the same even if the pH of the applied fusaric acid is varied. The quantitative breakdown of fusaric acid by the plant tissues is, therefore, not pH dependent.

Another fact we note from the table is that with decreasing doses of fusaric acid, correspondingly more is metabolized by the plant cells. Thus, when 0.24 mg. of fusaric acid is allowed to be taken up per gram of plant material, then 77.6 % of the applied quantity is metabolized by the plants at the end of a 48 hour period. When only half of this amount (0.12 mg.) is applied per gram of plant material, correspondingly more, i. e., 93.1 % of the applied quantity is metabolized. Thus a stage would be reached, when with still smaller quantities of fusaric acid, no more would be isolated in the free state, i. e., all would be metabolized by the plants.

The results obtained with fusaric acid are approximately the same as with patulin (clavacin), a toxin produced by certain *Aspergillus* species and other fungi (MIESCHER, 1950). Patulin combines in the tomato plants with the free -SH groups of biological importance and this accounts for its toxicity. MIESCHER (1950) has demonstrated that any quantity of patulin below 300 mg. per kg. fresh weight, once introduced in the tomato plants cannot be recovered back. Only quantities beyond this range remain unchanged in the plants because no more free -SH groups are available in the cells to combine with patulin in excess of the 300 mg./kg. limit.

In case of fusaric acid, however, such a simple relationship does not exist. Fusaric acid is metabolized by the plant cells and converted into numerous related substances. In our opinion some of the metabolic products are non-toxic but others are perhaps much more toxic than fusaric acid itself. To find out which of the metabolic products of fusaric acid are responsible for injury to the plant, we shall have to purify each one of the metabolic products and then test its activity with tomato plants. Such experiments are in progress and shall be reported on later.

F. Discussion

Dealing with wilt-diseases in plants, the toxin theory of disease has been emphasized for some years (GOTTLIEB, 1944 b). According to this theory, part of the symptoms on the host are directly ascribable to certain toxic metabolic products secreted by the pathogen in vivo. One of the most investigated organism in this regard has been *Fusarium lycopersici*, causing the wilt of tomato. Most of the symptoms naturally present on the diseased tomato plants can be reproduced when the cell-free culture filtrates of the pathogen are applied to the tomato cuttings (see, Introduction).

A very strong indirect evidence exists that all the wilting-toxins are also secreted by the pathogen in vivo (GÄUMANN, 1951 a). However, they have never been isolated from the diseased plants. This is perhaps due to the fact that toxins, once secreted by the pathogen in the host, are metabolized by the plant cells or converted into entirely different substances. For this reason it might not be possible to isolate these toxins from the diseased tomato plants in their original form. Evidence of other kind was, therefore, to be had to ascertain whether the metabolic products of the pathogen in vivo bear any relationship with the symptoms on the host. This necessitated the need for a clear understanding of the mode of toxin production in vitro in order to correlate such studies with in vivo metabolism of the pathogen.

We succeeded in demonstrating that the toxin production varies quantitatively from one strain to another under the same set of environmental conditions (GÄUMANN, NAEF-ROTH and MIESCHER, 1950; KERN, 1952). However, when these environmental conditions are changed, the quantity of toxin produced correspondingly changes. Thus, in Richard's medium strain 257 (avirulent) produces much more toxin (fusaric acid and lycomarasmin) than strain R-5-6 (virulent), but when the constituents of the Richard's medium are varied (specially carbon and nitrogen), the strain producing less toxin (R-5-6) produces more than the strain 257 (avirulent). When glucose is replaced by glycine as the exclusive carbon source, toxins are still produced. There is no reason why the virulent strains accordingly may not secrete more toxins in the host, as compared with the avirulent ones, where the chemical environment is different from the laboratory.

Restricting ourselves to fusaric acid, one of the known toxins produced by *F. lycopersici*, evidence is presented to show that it is not a direct product of sugar dissimilation, but is synthesized by the pathogen from some other secondary dissimilatory products, like amino-acids. Growth, amount of sugar consumed and pH bear no relationship with fusaric acid production in vitro. When various nitrogen containing compounds in the cultures are analysed, it is found that fusaric acid production bears a relationship with the amino-acid formation in culture medium. A strong probability exists that fusaric acid is produced from some amino-acid precursors. FLÜCK and RICHLE (1955) as a result of paper chromatographic studies have suggested that alanin and citrullin may be involved in the biosynthesis of fusaric acid. Further, fusaric acid is produced by actively metabolizing, young mycelium and the greatest amount is produced with 12—18 days time (compare KERN, 1952). This is at about the same time that the disease symptoms are visible in the infected tomato plants.

The studies on the metabolism of *F. lycopersici* in vivo with the help of 2-C^{14}-glycine demonstrate that certain symptoms on the host, viz., vein-clearing (FOSTER, 1946) are directly related to the secretion of metabolic toxic products of the pathogen. Thus, when tagged mycelium of *F. lyco-*

persici is introduced into tomato plants, it secretes certain marked substances which reach in the leaves far away from the infection centers in the stems. The leaves showing vein-clearing accumulate more than 4 times the radioactivity present in the healthy leaves on the same plants. Significant here are also the results obtained by DAVIS (1954) who demonstrated by grafting techniques that non-tomato scions show injury from the toxins of the pathogen present in the tomato stocks, although no mycelium is present in the scions.

By the help of radioautographic techniques, it is demonstrated that a metabolic product, perhaps similar to vasinfuscarin, is secreted by the pathogen in vivo. This toxic metabolic product is closely associated with the vessels showing browning and is precipitated on the walls of the vascular elements, when tissue sections are fixed in methanol. Since it is not demonstrable in healthy vessels of the diseased plants by methanol fixation, it is assumed that this toxin is not transportable to greater distances in the stems and is perhaps adsorbed on the walls of the vascular elements just beyond mycelium.

Apart from the toxins, the pathogen secretes a number of substances which are seemingly non-toxic to the host. A complete chemical analysis of the plants inoculated with tagged mycelium (both virulent and avirulent strains) shows that the principle substances secreted are proteins, amino-acids, sugars and various other uncharacterized acidic and basic substances. With our techniques, only the substances formed from the methylene group of glycine can be demonstrated because only the carbon of the methylene group was marked. There is no doubt that with another source of carbon used for tagging the mycelium (like glucose and sucrose) many other substances would be detected. There is apparently no qualitative difference in the substances secreted by the different strains (virulent as well as avirulent) of the pathogen. The main difference, keeping in view the limitations of our technique, is perhaps of a quantitative nature. Thus the virulent strain secretes more substances of protein nature in vivo than the avirulent strain. This is perhaps quite an expected fact, since both strains are capable of producing toxins in vitro but the avirulent strain cannot do so in vivo because it is kept in check in the vicinity of the focus of infection by the unknown resistance factors of the host (GÄUMANN, 1951 b; KERN, 1952).

All the facts described so far lend support to the toxin theory of disease in the case of tomato wilt. According to SCHEFFER and WALKER (1953), who studied the mechanism of wilt production in tomato plants due to *F. lycopersici*, the pathogen is present in all parts of the plant showing symptoms, specially vascular browning, leaf necrosis etc. They concluded therefrom that translocable toxins are not produced by *F. lycopersici* and majority of disease symptoms are caused by an impediment to water movement in the diseased stems. In contradiction to these authors, experiments conducted in this Institute by Dr. STEPHI NAEF-ROTH (unpublished) demon-

strate that from many tissues of the plants, showing very severe disease symptoms, the pathogen cannot be isolated out except from the vessels showing vascular discolouration. However, it is an undeniable fact that physiological disturbances contribute to the presence of some symptoms on the plant, but it is also equally undeniable that many other symptoms (like vein-clearing and vessel browning etc.) can be ascribed to the secretion of certain translocable toxic substances by the pathogen in vivo. DAVIS (1954) has further demonstrated that the association of the mycelium to the regions showing symptoms on the plants does not conflict with the idea of toxins also bringing about the symptoms in question.

Fusaric acid, after application at a minimal dose of 150 mg. per kg. fresh weight, is metabolized by the plants in various ways. Some of the applied fusaric acid is decarboxylated, some is bound up by the plant cells, some is converted into closely related substances and some remains unchanged. Approximately, up to 30 % of the fusaric acid is converted in the plants into an alcohol-insoluble fraction. Since fusaric acid forms chelate ring complexes with metal ions (TAMARI and KAJI, 1952 a, 1952 b, 1953 a), a possibility exists that this alcohol insoluble fraction represents such complexes of fusaric acid with metal ions in the cells. About 10 % of the applied fusaric acid is decarboxylated with the production of CO_2 and perhaps 3 n-butylpyridine, if we assume that the butyl side-chain remains intact in this process. 3 n-butylpyridine has a very toxic effect on the plant cells and, if our assumptions are correct, part of the toxicity of fusaric acid could be attributed to this substance. 20—25 % applied fusaric acid is converted into certain basic and neutral substances, which have not yet been completely identified. From the experience of other authors on animal organisms (WILLIAMS, 1947; LEIFER, 1951) it is presumed that some of these substances arise through N-methylation of the fusaric acid molecule and may eventually represent the end products of certain detoxicating mechanisms on the part the plant cells. About 30 % of the initially applied fusaric acid remains in a free form and may represent the excess beyond that required for causing injuries to the plant cells.

Perhaps there are a number of other products of metabolism of the side-chain of fusaric acid, but they could not be demonstrated with our techniques, because the fusaric acid was labeled only in the carboxyl group.

When fusaric acid is introduced in smaller doses in the tomato cuttings, comparatively much more is metabolized by the plants. Thus, at a concentration of about 200 mg. per kg. fresh weight, about 77 % fusaric acid is metabolized, while at 100 mg. per kg. fresh weight nearly 95 % is metabolized. In this way, with still lower doses of fusaric acid, a stage would be reached when no more free fusaric acid would be present in the plants. This gradual increase in the total quantity of fusaric acid metabolized by the plants with decreasing quantities of applied fusaric acid is perhaps due to the fact that with decreasing doses, fusaric acid is converted preferentially into some substance or substances, which are then responsible for

casuing injury. For verification of this hypothesis, the plant material will have to be fractionated everytime after uptake of diminishing doses of C^{14}-labeled fusaric acid and demonstration of preferential conversion into some definite substance. Such studies are in progress. The situation with fusaric acid would, therefore, be materially similar to patulin (MIESCHER, 1950; GÄUMANN, 1951 a). Patulin combines with thiol groups of biological importance and when it is applied to the plants, only that amount can be extracted back which is in excess of the amount required to saturate all the -SH groups.

The question of in vivo production of toxins can now be discussed in the light of the above facts. It has been demonstrated with a very great degree of certainty that *Fusarium lycopersici* produces toxins in the plants. These toxins are difficult to isolate from the diseased plants because they are partly metabolized and converted into other substances by the host (formation of chelate complexes of lycomarasmin, decarboxylation of fusaric acid etc.). DIMOND and WAGGONER (1953), discussing the role of toxins in disease production, have distinguished between two category of toxins. 1. Those produced in vitro and 2. those produced in vivo. The latter have been called 'vivotoxins'. Among the criteria laid down for the demonstration of vivotoxins, is their extraction from the diseased plants in a pure form and production of symptoms on healthy plants when this extracted toxin is applied to them. As an example of a true vivotoxin, DIMOND and WAGGONER cite the case of the toxin produced by *Pseudomonas tabaci* (BRAUN, 1950) which can be isolated from the diseased plants. The arguments given by DIMOND and WAGGONER are substantially correct with the restriction that some toxins can be isolated only in a metabolized form and not in their original state. In these cases, of course, direct evidence for the presence of toxins in diseased plants will be possible only with an exact knowledge of the mechanisms of action of these toxins.

Summary

1. It has been shown that a quantitative change in the constitution of Richard's medium causes a corresponding change in the quantity of toxins produced by the various strains of *F. lycopersici* Sacc. Thus, the virulent strain, producing lesser amounts of toxins (used in the widest sense of the word) in Richard's medium, produces more than the avirulent strain (257) when the quantities of carbon and nitrogen are varied in the medium.

2. With glycine as the exclusive carbon source in the medium, *F. lycopersici* produces all the three known toxins (vasinfuscarin, fusaric acid and lycomarasmin).

3. In the biosynthesis of fusaric acid the amino-acids seem to play a significant role and it is possible that some of them (like alanine and citrulline) serve as precursors of fusaric acid.

4. *F. lycopersici* can be tagged after growth for 5—8 days in a medium containing 90 μC/ml. of 2-C^{14}-glycine. At this level of radioactivity about 40 % of the fungal cells become inviable but the fungus does not lose it's virulence.

5. The tagged mycelium, when inoculated into healthy tomato plants, secretes certain radioactive toxic components responsible for 'vein-clearing' symptoms on the leaves and vascular browning on the stems.

6. All the metabolic products of the tagged pathogen in vivo are not of a toxic character; some apparently are non-toxic.

7. The tagged virulent and avirulent pathogens secrete, among other substances, proteins, amino-acids, sugars and certain uncharacterized acidic and basic substances. The virulent pathogen secretes more than 4 times the protein substances secreted by the avirulent pathogen in vivo.

8. C^{14}-labeled fusaric acid is metabolized when introduced into the tomato cuttings in the minimal dose (150 mg./kg. fresh weight). About 10 % is decarboxylated with the production of $C^{14}O_2$ and perhaps 3 n-butylpyridine. About 30 % is converted into alcohol insoluble fraction (chelated with metal ions?) and about 20 % into certain neutral and basic substances. In paper chromatograms, the neutral substances have a R_f of 0.20—0.22 and 0.51—0.53 in butanol, acetic acid and water solvent and the basic substances an R_f of 0.62—0.65. Approximately 30 % of the applied fusaric acid remains unchanged. This latter perhaps represents the quantity in excess of that required for causing injury to the plants.

9. A possibility is shown to exist that some of the metabolic products arise by N-methylation of fusaric acid, representing perhaps the end products of detoxicating mechanisms possessed by the host cells.

10. With decreasing doses of fusaric acid less and less amount of free fusaric acid (unmetabolized) remains in the plants. Thus, at about 200 mg./kg. fresh weight, about 77 % of the applied fusaric acid is metabolized, while at 100 mg./kg. about 93 % is metabolized by the host cells.

11. Fusaric acid causes injury perhaps by getting converted into some more toxic substances in the plants.

12. From a careful study of the results obtained in this work arguments are given for the role of toxic substances secreted by the pathogen in vivo in the production of an over-all disease picture on the host.

Zusammenfassung

1. Auf Richard-Nährlösung (S. 336) bildet der in dieser Arbeit verwendete nicht pathogene Stamm von *Fusarium lycopersici* Sacc. mehr Toxine (im weitesten Sinne des Wortes) als der pathogene Stamm. Wird jedoch in der Nährlösung das Mengenverhältnis von C und N verändert, so kann die

Toxinproduktion des pathogenen Stammes größer werden als diejenige des nicht pathogenen Stammes. Die Toxinbildung eines bestimmten Stammes ist also nicht konstant, sondern von der Ernährung abhängig.

2. *Fusarium lycopersici* vermag mit Glykokoll als einziger C-Quelle alle drei von ihm bis jetzt bekannten Toxine (Vasinfuscarin, Fusarinsäure und Lycomarasmin) zu bilden.

3. Bei der Biosynthese der Fusarinsäure durch *Fusarium lycopersici* scheinen Aminosäuren als Vorstufen eine bedeutende Rolle zu spielen. Nach den bisherigen Untersuchungen sind vor allem Alanin und Citrullin an diesen Vorgängen beteiligt.

4. Wächst *Fusarium lycopersici* während 5 bis 8 Tagen in einem Medium, das radioaktives Glykokoll enthält (mit C^{14} markiert; 90 μC/ml), so wird das Myzel radioaktiv markiert. Unter diesen Versuchsbedingungen bleiben etwa 60 % der Konidien keimfähig, und der Pilz behält seine Pathogenität bei.

5. Werden gesunde Tomatenpflanzen mit markiertem Myzel von *Fusarium lycopersici* infiziert, so scheidet der Pilz radioaktive Stoffwechselprodukte in die Wirtspflanze aus. Einige von ihnen sind nicht toxisch; andere sind toxisch und verursachen an Stengeln und Blättern charakteristische Krankheitssymptome.

6. Bei den in die Wirtspflanze ausgeschiedenen Stoffwechselprodukten handelt es sich vor allem um Proteine, Aminosäuren und Zucker. Der pathogene und der nicht pathogene Stamm unterscheiden sich vor allem in der Menge der gebildeten Proteine; diese ist beim pathogenen Stamm etwa viermal größer als beim nicht pathogenen.

7. Die einem Tomatensproß verabreichte markierte Fusarinsäure wird zum größten Teil chemisch verändert. Bei einer Toxindosis von 150 mg je kg Lebendgewicht wurden in der hier verwendeten Versuchsanordnung folgende Ergebnisse erhalten:

a) Rund 10 % der verabreichten Fusarinsäure werden decarboxyliert. Die Pflanze gibt $C^{14}O_2$ ab; als erstes Spaltprodukt wäre 3-n-Butylpyridin zu erwarten.

b) Rund 20 % der Fusarinsäure werden in neutrale und basische Verbindungen umgewandelt. Im Papierchromatogramm (mit einem Gemisch von Butanol, Essigsäure und Wasser als Lösungsmittel) wurden für die neutralen Substanzen R_f-Werte von 0,20 bis 0,22 und 0,51 bis 0,53, für die basischen Substanzen solche von 0,62 bis 0,65 gefunden.

c) Rund 30 % der verabreichten Fusarinsäure lassen sich mit Alkohol nicht mehr herauslösen; ihr Schicksal konnte noch nicht untersucht werden.

d) Rund 30 % der verabreichten Fusarinsäure konnten in unveränderter Form zurückgewonnen werden. Sie sind möglicherweise für das Zustandekommen der Schädigungen nicht von Bedeutung.

8. Wird die Dosis der verabreichten Fusarinsäure herabgesetzt, so sinkt auch der Prozentsatz der in der Pflanze nicht abgebauten Fusarinsäure. Bei einer Dosis von 200 mg je kg Lebendgewicht konnten in einem bestimmten Versuch 22 % der eingebrachten Fusarinsäure in unveränderter Form zurückgewonnen werden, bei 100 mg/kg dagegen nur noch 7 %.

9. Die chemische Natur und die biologische Bedeutung der verschiedenen Umwandlungsprodukte der Fusarinsäure konnten im einzelnen noch nicht untersucht werden. Es kann lediglich vermutet werden, daß einige der entstehenden Verbindungen für die Pflanze stark giftig, andere dagegen unwirksam sind.

The above investigations were carried out at the Department of special Botany of the Swiss Federal Institute of Technology under the guidance of Prof. Dr. E. GÄUMANN to whom the writer is grateful for his consistent encouragement, advice and the most intimate concern he showed in problems, both financial and scientific, arising from this work. For numerous suggestions, criticisms and a careful study of the manuscript, the writer is very thankful to Dr. H. KERN.

The investigations were financed by a generous grant by the Trustees of "FRITZ HOFFMANN-LA ROCHE-Stiftung zur Unterstützung biologischer Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz", to whom our thanks are due. The work was carried out during the tenure of a fellowship first from the Swiss Coordination Commission for Technical help and later from the "VOLKART-Stiftung", Winterthur (Switzerland). Grateful thanks are expressed to the authorities concerned.

Some parts of the work were carried out in the Organic Chemistry Laboratories of the Swiss Federal Institute of Technology under the direction of Prof. Dr. V. PRELOG and Dr. J. WÜRSCH, to whom the writer is grateful. Thanks are also due to PD. Dr. E. HARDEGGER and Mr. E. NIKLES for synthesizing the radioactive fusaric acid used in this investigation and many other suggestions. Last, but not the least, the writer is thankfoul to all his colleagues in the Laboratory, specially Dr. ST. NAEF-ROTH, Miss E. BACHMANN and Miss M. KECKEIS for help in many ways.

Literature cited

ANDERSON, C., DELABARRE, Y., and BOTHNER-BY, A. A., 1952: Chemical analysis and isotopic assay of Organic compounds. Anal. Chem. **24**, 1298—1303.

BLANK, H., MCCARTHY, P. L., and DELAMATER, E. D., 1951: A non-vacuum freezing dehydrating technique for histology, autoradiography and microbial cytology. Stain Tech. **26**, 193—197.

BOGOROCH, R., 1951: Detection of radioelements in histological slides by coating with stripping emulsion. Stain Tech. **26**, 43—50.

BRAUN, J. A., 1950: The mechanism of action of a bacterial toxin on plant cells. Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. **36**, 423—437.

BROWN, W., 1936: The physiology of host parasite relations. Bot. Rev. **2**, 236—287.

BURROWS, W., 1951: Endotoxins. Ann. Rev. Microbiol. **5**, 181—196.

CALVIN, M., HEIDELBERGER, C., REID, J. C., TOLBERT, B. M., and YANKWICH, P. E., 1949: Isotopic Carbon. John Wiley & Sons, New York.

CLAUSON-KAAS, N., PLATTNER, PL. A., and GÄUMANN, E., 1944: Über ein welkeerzeugendes Stoffwechselprodukt von *Fusarium lycopersici* Sacc. B. Schweiz. Bot. Ges. **54**, 523—528.

Davis, D., 1953: The role of enzymes in the etiology of *Fusarium* wilt of tomato. Phytopathology **43**, 470.

— —, Waggoner, P. E., and Dimond, A. E., 1953: Conjugated phenols in the *Fusarium* wilt syndrom. Nature **172**, 959—960.

— —, 1954: The use of intergeneric grafts to demonstrate toxins in the *Fusarium* wilt disease of tomato. Amer. J. Bot. **41**, 395—398.

Deuel, H., 1954: Über Störungen des Spurenelementhaushaltes der Pflanzen durch Welketoxine. Phytopath. Z. **21**, 337—348.

Dimond, A. E., and Waggoner, P. E., 1953 a: On the nature and role of vivotoxins in plant disease. Phytopathology **43**, 229—235.

— —, and — —, 1953 b: The physiology of lycomarasmin production. Phytopathology **43**, 195—199.

— —, and — —, 1953 c: The water economy of *Fusarium* wilted tomato plants. Phytopathology **43**, 619—623.

Endicott, K. M., and Yagoda, H., 1947: Microscopic histo-radiographic technique for location and quantitative estimation of radioactive elements in tissues. Proc. Soc. Expt. Biol. Med. **64**, 170—172.

Evans, T. C., 1947: Radioautographs in which the tissue is mounted directly on the photographic plate. Proc. Soc. Expt. Biol. Med. **64**, 313—315.

Fitzgerald, J. P., Eidinoff, M. L., Knoll, J. E., and Simmel, E. B., 1951: Tritium in radioautography. Science **114**, 494—498.

Flück, V., and Richle, K. H., 1955: Papierchromatographische Untersuchungen über den Aminosäuren-Stoffwechsel von *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopath. Z. **24**, 455—461.

Foster, J. W., 1949: Chemical activities of fungi. Academic Press Inc., New York, N. Y.

Foster, R. E., 1946: The first symptom of *Fusarium* wilt: clearing of the ultimate veinlets in the leaf. Phytopathology **36**, 691—694.

Gäumann, E., 1946: Types of defensive reactions in plants. Phytopathology **36**, 624—633.

— —, 1951 a: Problems of pathological wilting in plants. Adv. Enzymology **11**, 401—437.

— —, 1951 b: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl., Basel.

— —, 1951 c: Neuere Erfahrungen mit Welketoxinen. Experientia **7**, 441—447.

— —, Naef-Roth, St., and Miescher, G., 1950: Untersuchungen über das Lycomarasmin. Phytopath. Z. **16**, 257—288.

— —, — —, et Kobel, H., 1952 a: L'acide fusarique, une seconde toxine de flêtrissement produite par *Fusarium lycopersici* Sacc. C. r. Ac. Sc. Paris **234**, 173—174.

— —, and — —, 1952 b: Über Fusarinsäure, ein zweites Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopath. Z. **20**, 1—38.

— —, — —, and Ammann, A., 1952: Über den Einfluß einiger Welketoxine und Antibiotica auf die osmotischen Eigenschaften pflanzlicher Zellen. Phytopath. Z. **19**, 160—220.

— —, Kern, H., and Sauthoff, W., 1952: Untersuchungen über Welketoxine. Phytopath. Z. **18**, 404—415.

— —, Stoll, Ch., and Kern, H., 1953: Über Vasinfuscarin, ein drittes Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopath. Z. **20**, 345—347.

— —, and Naef-Roth, St., 1954: Über die chelierende Wirkung einiger Welketoxine. Phytopath. Z. **21**, 349—366.

— —, and — —, 1955: Über die chelierende Wirkung einiger Welketoxine. II. Die Verschiebungen der Toxizität durch steigende Zusätze von Asche aus jungen Tomatensprossen. Phytopath. Z. **23**, 147—160.

Gothoskar, S. S., and Scheffer, R. P., 1953: Pectic enzymes in the physiology of *Fusarium* wilt of tomato. Phytopathology **43**, 472.

— —, — —, Walker, J. C., and Stahmann, M. A., 1953: The role of pectic enzymes in *Fusarium* wilt of tomato. Phytopathology **43**, 535—536.

GOTTLIEB, D., 1943: The presence of a toxin in tomato wilt. Phytopathology **33**, 126—135.

— —, 1944: The mechanism of wilting caused by *Fusarium bulbigenum* var. *lycopersici*. Phytopathology **34**, 41—59.

GROSS, A. V., and SNYDER, J. C., 1947: Radioautography with C^{14}. Science **105**, 240—241.

GROSS, J., BOGOROCH, R., NADLER, N. J., and LEBLOND, C. P., 1951: The theory and methods of the radioautographic localization of radio-elements in tissues. Amer. J. Roentgenol. Rad. Therapy **65**, 420—458.

HERZ, R. H., 1951: Photographic fundamentals of Autoradiography. Nucleonics **9**, 24—39.

HITCHINGS, G. H., and FISKE, C. H., 1941: The determination of the purines. J. Biol. Chem. **140**, 491—499.

HOFFMANN, P. F., and ZUCKERMAN, B. M., 1954: Oak wilt fungus labeled with C^{14}. Science **120**, 106.

HOLLEY, R. W., BOYLE, F. P., and HAND, D. B., 1950: Studies on the fate of radioactive 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in bean plants. Arch. Biochem. **27**, 143—151.

KAMEN, M. D., 1951: Radioactive tracers in Biology, 2nd. Ed. Academic Press Inc., New York.

KERN, H., 1952: Über die Beziehungen zwischen dem Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten und ihrer Resistenz gegen *Fusarium lycopersici*. Phytopath. Z. **19**, 351—382.

— —, and SANWAL, B. D., 1954: Untersuchungen über den Stoffwechsel von *Fusarium lycopersici* mit Hilfe von radioaktivem Kohlenstoff. Phytopath. Z. **22**, 449—453.

KOBEL, F., 1951: Untersuchungen über toxische Stoffwechselprodukte von *Nectria cinnabarina* (Tode) Fr. Phytopath. Z. **18**, 157—195.

LEIFER, E., ROTH, L. J., HOGNESS, D. S., and CORSON, M. H., 1951: The metabolism of radioactive nicotinic acid and nicotinamide. J. Biol. Chem. **190**, 595—602.

LINSKENS, H. F., 1955: Der Einfluß der toxigenen Welke auf die Blattausscheidungen der Tomatenpflanze. Phytopath. Z. **23**, 89—106.

LISSITZKY, S., and MICHEL, R., 1952: Substances organiques marquées par les radio-isotopes. Bull. soc. Chim. France. 1952, 891—903.

LUZ, G., 1934: Über den Stoffwechsel von *Fusarium lycopersici* und *Fusarium lini*. Phytopath. Z. **7**, 585—638.

MCKENZIE, H. A., and WALLACE, H. S., 1954: The Kjeldahl determination of nitrogen: A critical study of digestion conditions, temperature, catalyst and oxydizing agents. Australian J. Chem. **7**, 55—70.

MEYER-SCHÜTZENMEISTER, L., 1950: Die physikalischen Voraussetzungen für das Arbeiten mit künstlichen radioaktiven Substanzen. Naturwiss. **35**, 501—517.

MIESCHER, G., 1950: Über die Wirkungsweise von Patulin auf höhere Pflanzen, insbesondere auf *Solanum lycopersicum* L. Phytopath. Z. **16**, 369—397.

MORTON, A. A., 1938: Laboratory technic in Organic Chemistry. New York.

PEARSON, I. A., HAMMER, J. M., CORRIGAN, K. E., HAYDEN, H. S., and MALLMAN, W. L., 1950: Use of radioactive isotopes in the study of fungi and bacteria. Amer. J. Clin. Path. **20**, 282—286.

PELC, S. R., 1947: Autoradiographic technique. Nature **160**, 749.

PEPKOWITZ, L. P., and SHIVE, J. W., 1942: Kjeldahl nitrogen determination. Ind. Eng. Chem. **14**, 914—916.

PLATTNER, PL. A., and CLAUSON-KAAS, N., 1944: Über ein Welkeerzeugendes Stoffwechselprodukt von *Fusarium lycopersici* Sacc. Helv. Chim. Acta **28**, 188—195.

— —, KELLER, W., and BOLLER, A., 1954: Konstitution und Synthese der Fusarinsäure. Helv. Chim. Acta **37**, 1379—1392.

POPE, C. G., and STEVENS, M. F., 1939: The determination of amino-nitrogen using a copper method. Biochem. J. **33**, 1070—1077.

RAYNAND, M., 1948: Dosage de l'ammoniaque dans les milieux biologique. Bull. Soc. Chim. Biol. **30**, 713—715.

REID, A. F., WEIL, A. S., and DUNNING, J. R., 1947: Properties and measurement of C^{14}. Anal. Chem. **19**, 824—827.

ROCHE, J., LISSITZKY, S., and MICHEL, R., 1954: Chromatographic analysis of radioactive iodine compounds from the Thyroid gland and body fluids. In GLICK, D., Methods of Biochemical Analysis **1**, 243—264.

SANWAL, B. D., 1955: Isotopentechnik in „Papierchromatographie in der Botanik", Ed. H. F. LINSKENS, Springer Verlag, Berlin.

SAUTHOFF, W., 1955: Über toxische Stoffwechselprodukte in Kulturfiltraten von *Botrytis cinerea* **Pers.** Phytopath. Z. **23**, 1—36.

SCHAFFER, P. A., and HARTMANN, A. F., 1920: The iodometric determination of Copper and it's use in sugar analysis. II. Methods for the determination of reducing sugars in blood, urine, milk and other solutions. J. Biol. Chem. **45**, 315.

SCHROEDER, W. A., KAY, L. M., and MILLS, R. S., 1950: Quantitative determination of amino-acids by iodometric titration of their copper salts. Anal. Chem. **22**, 760—763.

SCHEFFER, R. P., and WALKER, J. C., 1953: The physiology of *Fusarium* wilt of tomato. Phytopathology **43**, 116—125.

STOLL, CH., 1954: Über Stoffwechsel und biologisch wirksame Stoffe von *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Woll., dem Erreger der Bakanaekrankheit. Phytopath. Z. **22**, 233—274.

TAMARI, K., and KAJI, J., 1952, 1953: Studies on the mechanism of injurious action of fusarinic acid on plant growth. Parts 1—8. J. Agr. Chem. Soc. Japan **26**, 223—227, 295—298, 298—303, 345—349, 349—353; **27**, 245—249, 249—252, 302—306.

— —, and — —, 1953: Studies on the mechanism of injurious action of 2-methyl-pyridin-4-carboxylic acid on plant growth. Parts 1—3. J. Agr. Chem. Soc. Japan **27**, 144—147, 147—150, 159—161.

TIETZ, H., 1952: Eine Schnelleinbettungsmethode für histologische Präparate mit „Synthawachs-Gemischen" unter Umgehung der Alkoholstufen, besonders nach Imbibition von nichtwasser- und lipoidlöslichen Stoffen. Z. f. wiss. Mikros. Tech. **61**, 129—139.

— —, 1953: Der ^{32}P-markierte Diäthylthionophosphorsäureester des β-Oxäthyl-thioäthyläthers, seine Aufnahme in die höhere Pflanze und sein Wanderungsvermögen. Diss., Universität Köln, 60 p.

TREADWELL, W. D., 1947: Tabellen und Vorschriften zur qualitativen Analyse. Verlag Deuticke, Wien.

TUREL, F., 1952: Der Einfluß von Aneurin und Zink auf das Wachstum und die Toxinproduktion von *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr. Phytopath. Z. **19**, 307—342.

VAN SLYKE, D. D., and FOLCH, J., 1940: Manometric Carbon determination. J. Biol. Chem. **136**, 509—541.

— —, STEELE, R., and PLAZIN, J., 1951: Determination of total carbon and it's radioactivity. J. Biol. Chem. **192**, 769—805.

— —, PLAZIN, J., and WEISIGER, J. R., 1951: Reagents for the VAN SLYKE-FOLCH wet carbon combustion. J. Biol. Chem. **191**, 299—304.

WADE, H. W., 1952: Notes on the Carbowax method of making tissue sections. Stain. Tech. **27**, 71—79.

WAGGONER, P. E., and DIMOND, A. E., 1954: Reduction in water flow by mycelium in vessels. Amer. J. Bot. **41**, 637—640.

WARREN, J. R., 1951: The use of radioisotopes in determining the distribution of *Bacterium stewartii* Erw. Smith, within corn plants. Phytopathology **41**, 794—800.

Tamaoki, K. I., Brown, J. W., Fields, M., and Kohan, J., 1952: Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. I. CO_2 production by bean plants treated with labeled 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Plant Physiol. 27, 293—301.

— —, Tamaoki, I. N., Lockner, J. A., Kennedy, J. H., and Fields, M., 1952: Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. II. Metabolism of side-chain by the bean plants. Arch. Biochem. Biophys. 40, 277—285.

Wellman, F. L., 1939: A technique for studying host resistance and pathogenicity in tomato Fusarium wilt. Phytopathology 29, 945—950.

— —, 1943: Comparative toxic effects of extracts from mild and virulent isolates of tomato wilt *Fusarium*. Phytopathology 33, 1204—1217.

Wheeler, H. E., 1951: The use of C^{14}-labeled sucrose for "tagging" mycelium. Phytopathology 41, 38.

— —, 1952: The use of radiocarbon for tagging fungi. Phytopathology 42, 431—435.

— —, 1953: Detection of microbial toxins by the use of radioisotopes. Phytopathology 43, 236—238.

Williams, R. T., 1947: Detoxication mechanisms. London.

Winstead, N. N., and Walker, J. C., 1954: Production of vascular browning by metabolites from several pathogens. Phytopathology 44, 153—158.

Woodward, C. C., and Kamerbeek, G. S., 1953: The composition of plant fractions extracted with 82% alcohol. Plant Physiol. 28, 535—538.

Yabuta, T., Kambe, K., and Hayashi, T., 1934: Biochemistry of the bakanae fungus. I. Fusaric acid, a new product of the bakanae fungus. J. Agr. Chem. Soc. Japan 10, 1059—1068 [cited from Chem. Abs. 29, 1132, 1935].

Yankwich, P. E., 1948: Loss of radioactivity from barium carbonate samples. Science 107, 681—683.

— —, Norris, T. H., and Huston, J., 1947: Correcting for the absorption of weak β-particles in thick samples. Anal. Chem. 19, 439—441.

Zinner, H., 1954: Die Bestimmung der Fusarinsäure mit Hilfe der Papierchromatographie. Phytopath. Z. 22, 227—228.

— —, 1955: Über den Einfluß der Ernährung auf die Toxinempfindlichkeit von Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. 23, 49—88.

Aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. H. Braun

Untersuchungen über *Alternaria porri* (E.M.) Neerg. f. sp. *solani* als Knollenparasit

Von

Brigitta Gräfin von Westphalen

Mit 22 Abbildungen

Inhalt: Einleitung. — A. Symptomatologie des *Alternaria*-Befalles an Knollen und ähnliche Schadbilder. 1. *Alternaria*-Knollenfäule; 2. Knollennekrose der Sorte Deutsche Erstlinge; 3. *Phoma*-Trockenfäule; 4. Kleine eingesunkene Schalenflecke. — B. Infektionsversuche an Knollen. 1. Methodisches, a) Herkünfte des Pilzes, b) Infektionsmethode und Anordnung der Versuche, c) Bonitierungsschema; 2. Einfluß des Knollenalters auf die Entwicklung der Faulstellen von *A. solani*, a) Versuche bei Lagerung im Keller, b) Versuche bei Lagerung im Klimaraum; 3. Folgerungen. — C. Einflüsse auf das Wachstum des Erregers in Beziehung zur Physiologie der lagernden Knolle. 1. Methodisches; 2. Temperatur; 3. Zuckergehalt. — D. Diskussion. — Zusammenfassung. — Literaturverzeichnis.

Einleitung

Alternaria porri (Ell.) Saw. f. sp. *solani* (E. et M.) Neergaard, der Erreger der Dürrfleckenkrankheit (Sorauer, 1896) und einer Knollenfäule der Kartoffel, ist nach der Entdeckung in seinen biologischen Wesenszügen relativ gut bekannt geworden. Hierum machten sich besonders die amerikanischen Autoren Rands, Folsom, Bonde und Gratz verdient. In Deutschland teilten nach dem ersten Bericht von Braun (1935) über den Pilz als Knollenparasiten Braun (1938 und 1952 a), Klaus (1941) und Teschner (1951) ihre Arbeitsergebnisse mit.

Noch unzureichend geklärte Fragen betreffen sowohl die Epidemiologie des Pilzes im Felde als auch das Auftreten der Fäule im Lager. Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden durch den letztgenannten Fragenkomplex angeregt, da nach 1945 zahlreiche Meldungen der Praxis über erhebliches Auftreten den Wunsch nach befallsverhindernden Maßnahmen dringlich werden ließen. Außerdem war die Frage umstritten, ob die Alternaria-Knollenfäule als geheimer Mangel im Sinne der Frankfurter Kartoffelgeschäftsbedingungen (1950) anzusprechen sei. Auf die bis zum Jahre 1951

vorliegenden Erfahrungen konnte bei der Beantwortung dieser Fragen nicht zurückgegriffen werden, da hierfür nur zwei Untersuchungen überhaupt in Betracht kamen (Klaus, 1941; Teschner, 1951). Dabei verfügte Klaus noch nicht über eine sichere Infektionsmethode, infolgedessen konnten wichtige Versuche nur an Kartoffelscheiben, die zudem allein von Frühsorten stammten, durchgeführt werden. In Teschners Versuchen entsprach die Lagertemperatur (im Laboratorium) den praktischen Verhältnissen wenig, auch waren ihr — infolge Fehlens einer Klimaanlage — Reiheninfektionsversuche zum eingehenden Nachweis der wechselnden Knollendisposition für die Fäule nicht möglich. Zwei Beobachtungen Teschners erschienen besonders wichtig und interessant:

1. Die Isolierung des Erregers aus nur acht einer Reihe verdächtiger Knollenproben in den Jahren 1949 bis 1951.
2. Die Feststellung einer stärkeren Ausbreitung der Fäule bei Knolleninfektionen gegen Ende der Lagerperiode.

Die erste Beobachtung Teschners dürfte die Verhältnisse des Auftretens von *A. solani* in den vergangenen Jahren zutreffend kennzeichnen, da die Fäule zwar im Winter 1948/49 recht erheblich um sich gegriffen hatte, in den folgenden Wintern — der Untersuchungszeit Teschners und später — aber bedeutungslos war. Die Zahlen der bei einem Gutachter im Rheinland bekannt gewordenen Fälle bestätigen diese Entwicklung: Im Frühjahr 1949 wurde 31mal, 1950 und 1951 siebenmal bzw. einmal Alternariabefall an Knollen festgestellt, im Verlauf der eigenen Untersuchungen war bis zum Frühjahr 1953 in 26 als verdächtig bezeichneten Knollenproben nur viermal der Erreger festzustellen. Es liegt deshalb nahe, einen Zusammenhang zwischen dem feucht-kalten Witterungsverlauf des Sommers 1948 und dem Befall des folgenden Winters anzunehmen, so daß mit der Möglichkeit eines erneuten, spontanen Auftretens unter entsprechenden Voraussetzungen zu rechnen ist. Darüber hinaus muß angenommen werden, daß die Alternaria-Knollenfäule in der Praxis nicht immer hinreichend sicher diagnostiziert worden ist; der Symptomatologie dieser Fäule und ihr ähnlicher Erscheinungen ist daher in dieser Arbeit besonderes Interesse zugewendet worden.

Die zweite Beobachtung Teschners regte schließlich die Untersuchung der Verschiebungen des Wirt-Parasit-Verhältnisses von Knolle und Pilz unter dem Einfluß der Umweltbedingungen und physiologischer Eigenschaften beider Partner an, da hieraus wesentliche Anhaltspunkte für die Beantwortung der praktisch interessierenden Fragen erwartet werden durften.

A. Symptomatologie des Alternaria-Befalles an Knollen und ähnliche Schadbilder

1. *Alternaria*-Knollenfäule

Die Symptome der Alternaria-Knollenfäule sind bereits in einigen früheren Arbeiten (Braun, 1935; Klaus, 1941; Teschner, 1953) beschrieben worden, sollen aber in diesem Rahmen erneut abgehandelt werden, da bei

meinen Untersuchungen die Tiefenausbreitung der Fäule gegenüber der bisher fast ausschließlich beschriebenen flächigen Ausbreitung so häufig auftrat, daß eine alternative Gegenüberstellung gerechtfertigt ist.

Im Anfangsstadium der Erkrankung weisen die Knollen kleine, dunkle, etwas eingesunkene Flecke auf, die häufig gelappte Umrisse zeigen und sich gelegentlich hart anfühlen (Abb. 1). Da die Härte der Faulstellen keineswegs immer festzustellen war, kann sie nur begrenzt als spezifisches Merkmal der Alternaria-Knollenfäule gelten.

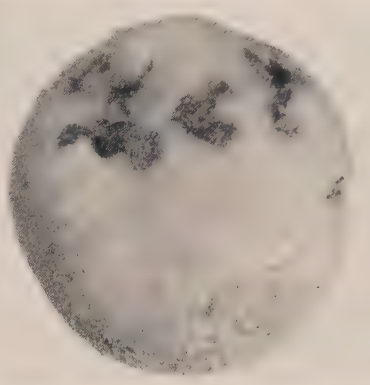

Abb. 1. Knolle der Sorte Deutsche Erstlinge mit *Alternaria*-Faulflecken

Abb. 2. Querschnitt durch die Knolle der Abb. 1

Ein Schnitt durch eine solche Faulstelle (Abb. 2) bestätigt, daß das kranke Gewebe am Rande durch eine Wundkorkschicht scharf von dem gesunden abgegrenzt und daher leicht abzuheben ist. Die Wundkorkbildung wurde bereits von Klaus (1941) untersucht und durch Abbildungen veranschaulicht.

Die fortschreitende Entwicklung führt im wesentlichen zu zwei verschiedenen Befallsbildern.

Unter relativ großen Faulstellen ist das Gewebe nur bis zu einer Tiefe von etwa 0,8 cm gebräunt. Die Schale der Flecken erscheint geriffelt, und das umliegende gesunde Gewebe hebt sich wulstartig hervor (Abb. 3 und 4).

Neben diesem Erscheinungsbild, wie es bisher als typisch angesehen wurde, kann es auch zu einer geringeren Flächenausbreitung der Fäule kommen, die aber dafür das Innere der Knolle erheblich tiefer erfaßt (Abb. 5 und 6). Dabei erstreckt sich das befallene Gewebe in stumpfem Winkel bis zur Knollenmitte und nur selten darüber hinaus. Durch Spannungen entsteht ein Hohlraum, der oft von hellgrauem Alternaria-Luftmyzel erfüllt ist. Zahlreiche Versuche ergaben, daß aus dem befallenen Gewebe selbst und dem entstandenen Hohlraum zunächst nur *A. solani* zu isolieren ist, während andere Organismen (*Fusarium* sp.) erst später zur Entwicklung gelangen. Die Sekundärparasiten überwuchern *A. solani* derart, daß der primäre Alternaria-Befall nicht mehr erkennbar und die Isolierung des Pilzes unmöglich ist. Die

Beobachtungen GOOSSENS (1937) über die Tiefenausbreitung von *A. solani* in Verbindung mit „Kanälchenbildung" ließen sich in meinen Versuchen nicht bestätigen.

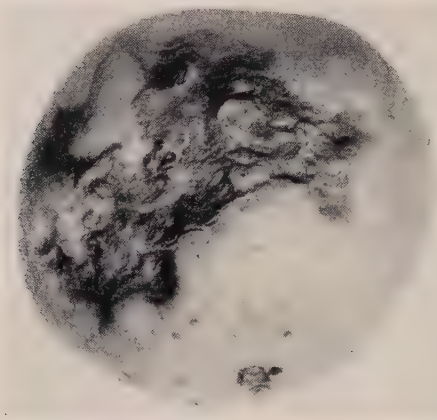

Abb. 3. Knolle der Sorte Virginia mit großer Flächenausbreitung

Abb. 4. Querschnitt durch die Knolle der Abb. 3

Die zuletzt beschriebene Form der Alternaria-Knollenfäule ist zweifellos die Ursache für erhebliche Schäden im Winterlager. Sie erfaßt einen großen Teil des Knollenfleisches und wirkt in der Regel als Schrittmacher für Folgeparasiten, die eine vollkommene Vernichtung befallener Knollen herbeiführen.

Nach dem Eindringen der Fäule in die Tiefe konnte ich nie nachträgliche Flächenausbreitung und umgekehrt nach erheblicher Flächenausbreitung nie tiefgehende Bräunung oder Hohlraumbildung beobachten. Diese Beobachtung trifft sowohl bei natürlich befallenen Knollen als auch nach künstlichen Infektionen zu. Beide Erscheinungsformen der fortgeschrittenen Alternaria-Knollenfäule treten unter gleichen Bedingungen (Impfmaterial, Kartoffelsorte, Umweltfaktoren) nebeneinander auf, so daß die Ursache der unterschiedlichen Entwicklung noch unklar bleibt.

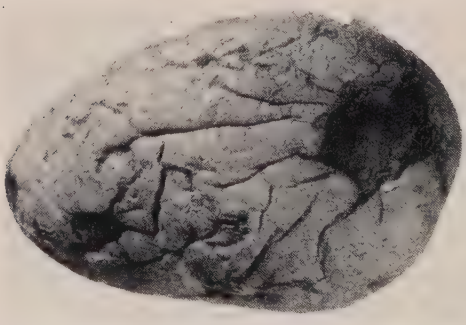

Abb. 5. Knolle der Sorte Bintje mit Tiefenausbreitung

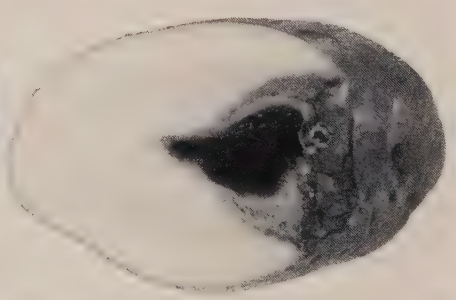

Abb. 6. Querschnitt durch die Knolle der Abb. 5

Konidienentwicklung auf Knollen konnte ich auch bei hoher relativer Luftfeuchtigkeit (80 bis 100 %) nie beobachten. Dieser Befund scheint mit den Ergebnissen der früheren Autoren übereinzustimmen, da gegenteilige Auffassungen nicht vertreten werden.

Die Symptome der Alternaria-Knollenfäule werden häufig mit anderen — noch zu beschreibenden — Schadbildern verwechselt, da die Differenzierung makroskopisch oft unmöglich ist. Zum exakten Nachweis läßt sich daher die Isolierung des Erregers auf geeignetem Nährboden nicht umgehen. Die charakteristische Gelbfärbung — „Bernsteinfarbe" (Teschner, 1951) — des Nährbodens (z. B. von Biomalz-Agar) ermöglicht es, *A. solani* bereits nach 48 Stunden zu erkennen und damit eine sichere Diagnose zu stellen.

2. Knollennekrose der Sorte Deutsche Erstlinge

Knollen der Sorte Deutsche Erstlinge können an der Oberfläche eine oder mehrere eingesunkene Faulstellen aufweisen, die im wesentlichen drei verschiedene Formen zeigen und von Alternaria-Knollenfäule nur in bestimmten Fällen zu unterscheiden sind:

1. schmale, langgestreckte Streifen (Abb. 7),
2. ein Pfropfen gesunden Gewebes, der von einer mehr oder weniger geschlossenen, abgestorbenen Zone umgeben ist (Abb. 8),
3. größere, häufig gerundete Flecke (Abb. 10).

Das Schnittbild läßt in allen drei genannten Fällen (Abb. 9, Abb. 11) meist größere abgestorbene Partien, gelegentlich auch Höhlungen erkennen. Nur selten bleibt die Bräunung flach unter dem Faulfleck, zuweilen auch keilförmig (Abb. 9, links oben). Der unter 2. beschriebene Pfropfen ist durch zerstörtes Gewebe unterminiert (Abb. 9, rechts oben).

Abb. 7. Knollennekrose der Sorte Deutsche Erstlinge, Form 1: Streifen

Da sich noch nicht entscheiden ließ, ob die Absterbeerscheinungen aus dem Knolleninneren zur Peripherie oder umgekehrt fortschreiten, besteht die Möglichkeit, daß die unter 1. bis 3. beschriebenen Symptome ineinander übergehen können.

Die Unterscheidung dieser Nekrose von Alternaria-Knollenfäule ist beim Oberflächen-Schadbild allein im Falle 2 (Pfropfen) möglich. Das Schnittbild weicht nur bei unregelmäßiger Ausdehnung der angegriffenen Fläche ab, die bei Tiefenausbreitung von *A. solani* (s. Abb. 5) keilförmig zu verlaufen pflegt. Die Trennung von gesundem und krankem Gewebe ist meist nicht so scharf wie bei *A. solani.*

Knollen mit diesem Schadbild werden seit 1951 alljährlich unter Alternaria-Verdacht dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn eingesandt. Zahlreiche Versuche, einen Erreger zu isolieren, die innerhalb einer Lagerperiode monatlich mit verschiedenen Nährböden (Biomalz-, Kartoffel-, Glukose-, Standardagar) durchgeführt wurden, verliefen negativ, da

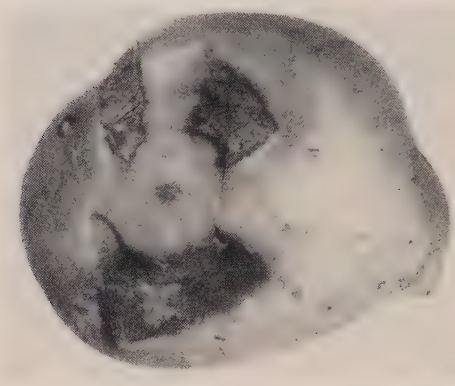

Abb. 8. Knollennekrose der Sorte Deutsche Erstlinge, Form 2: Runde Zone

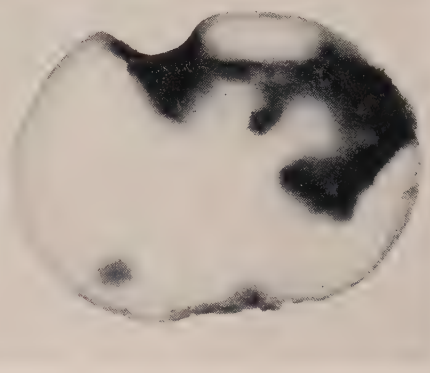

Abb. 9. Querschnitt durch die Knolle der Abb. 8

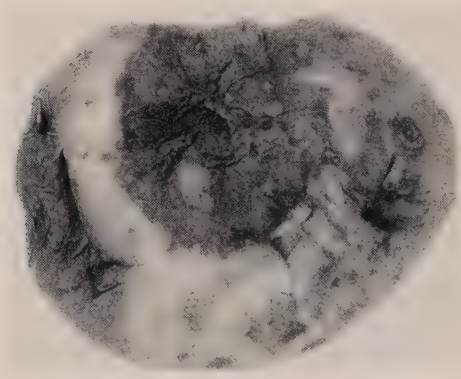

Abb. 10. Knollennekrose der Sorte Deutsche Erstlinge, Form 3: Große Flecke

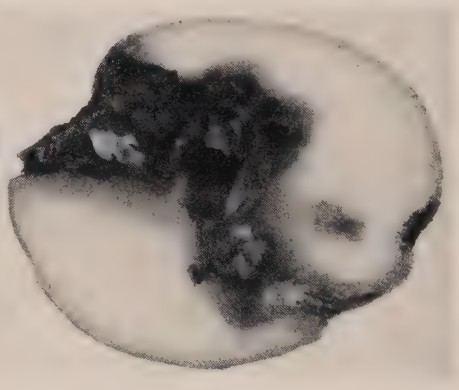

Abb. 11. Knollennekrose der Sorte Deutsche Erstlinge im Querschnitt mit Höhlenbildung und Entwicklung von Folgeparasiten

weder *A. solani* noch andere Organismen auf den Platten wuchsen. Auch Knolleninfektionen mit kranken Gewebestücken blieben ohne Erfolg. Über das eventuelle Fortschreiten der Krankheit im Knolleninneren ist vorläufig eine Aussage nicht möglich. Da aber zu beobachten war, daß erkrankte Knollen wie bei fortgeschrittenem Alternaria-Befall (s. Abb. 5) von Folgeparasiten (*Fusarium* sp.) erfaßt werden, können im Lager zweifellos schwere Schäden entstehen.

Allem Anschein nach ist diese Knollennekrose physiologisch bedingt und unter die nichtparasitären Krankheiten einzureihen. Sie würde dann der

Pfropfenbildung (Braun, 1934) und Eisenfleckigkeit (Ehrke, 1935 und 1935 a) nahestehen und nicht als Fäule im eigentlichen Sinne anzusehen sein. Die von Verhoeven (1953) unter dem Begriffe „Kringerigheid" zusammengefaßten Krankheitserscheinungen ähneln den hier allein bei Deutschen Erstlingen beobachteten Symptomen wohl, ihre Identität möchte ich jedoch vorläufig dahingestellt sein lassen. Soweit in Veröffentlichungen über *A. solani*-Befall an der Sorte Deutsche Erstlinge berichtet wird, ohne daß Isolierungen durchgeführt wurden, scheint bei der Verwertung der Befunde Zurückhaltung geboten zu sein.

3. *Phoma*-Trockenfäule

Das Auftreten einer durch den Pilz *Phoma foveata* Foister verursachten Knollenfäule meldeten in Deutschland zuerst Braun (1953) und Braun und Voss (1954). Die erkrankten Knollen wurden zunächst als Alternaria-faul angesehen, und erst durch Isolierung des Erregers mit anschließender erfolgreicher Reinfektion gelang es, den Irrtum zu klären. Die Krankheit hatte bis dahin mit Sicherheit nur in Schottland zu größeren Verlusten geführt. Dort wurde sie erstmalig von Alcock und Foister 1936 beobachtet und später von Foister (1940 und 1952) unter dem Namen „Gangrene" erwähnt.

Die Phoma-Fäule äußert sich — soweit bisher bekannt — in Gestalt brauner, eingesunkener Flecke, die nach Foister (1940) einem Daumendruck ähneln und 1 bis 2 cm im Durchmesser erreichen. Die Fäule dringt in der Regel nicht tiefer als etwa 5 mm in das Knolleninnere vor.

Im Anfangsstadium ist die Unterscheidung von Alternaria- und Phoma-Fäule durch die kreisrunde, nicht gelappte Form der Phoma-Flecke möglich (Abb. 12). Im Schnittbild sind beide Fäulen ähnlich, da sich das kranke Gewebe leicht abheben läßt. Bei fortschreitender Entwicklung dringt *Ph. foveata* nur flach in die Knolle ein und ist dann lediglich von Alternaria-Knollenfäule mit Tiefenausbreitung zu unterscheiden.

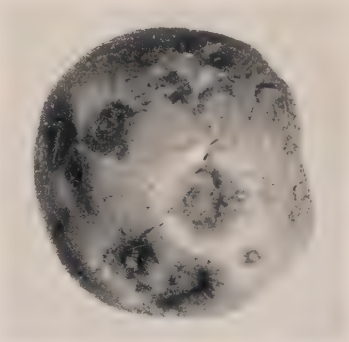

Abb. 12. Knolle der Sorte Bona mit Phoma-Trockenfäule

4. Kleine eingesunkene Schalenflecke

Auf Knollenoberflächen können bis zu 2 mm tief eingesunkene, kreisrunde Flecke mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1 cm auftreten, wobei meist eine Lentizelle von eingesunkenem Gewebe umgeben ist. Größere Schalenflecke entstehen offenbar durch Vereinigung mehrerer Schadstellen. Das Knollengewebe ist nur wenige Millimeter tief angegriffen und läßt sich wie bei flächiger Alternaria-Fäule gut abheben. Dieses Schadbild soll nach Behandlung von Knollen mit Rindite (sieben Teile $C_2H_4Cl\,OH$, drei Teile

$C_2H_4Cl_2$, ein Teil CCl_4 = Mittel zur Unterbrechung der Keimruhe der Kartoffel) aufgetreten sein und wurde irrtümlich als Alternaria-Fäule gedeutet.

Nach meinen Beobachtungen konnten identische oder zumindest sehr ähnliche Knollenflecke durch Überdosierung von Rindite und Ammoniakbegasung (Abb. 13) hervorgerufen werden. Diese Krankheitserscheinung dürfte auf die von PETHYBRIDGE (1919, zit. WHITEHEAD et al., 1953) als „pit-rot" beschriebene pathologische Veränderung zu beziehen sein. PETHYBRIDGE konnte es wahrscheinlich machen, daß „pit-rot" nach übermäßigem Desinfizieren von Knollen mit Sublimat und Ammoniakbegasung entsteht. JOHANSEN (1948) glaubt, nach ihren Beobachtungen für das Auftreten in Mieten Ammoniakanreicherung verantwortlich machen zu können, und weist auf die Verwechslungsmöglichkeit mit Alternaria-Knollenfäule hin.

Abb. 13. Knolle der Sorte Bona mit künstlich durch Ammoniakbegasung erzeugten Vergiftungserscheinungen (pit-rot)

B. Infektionsversuche an Knollen

1. Methodisches

a) Herkünfte des Pilzes

Für die Infektionsversuche beabsichtigte ich zunächst, Herkünfte der *A. solani* von Tomatenfrüchten (Kelchendfäule), Kartoffelblättern (Dürrflecken) und Kartoffelknollen (Alternaria-Knollenfäule) zu benutzen.

Die durch Isolierung aus krankem Gewebe gewonnenen Kartoffelblattherkünfte sind in der folgenden Aufstellung gekennzeichnet:

Nr.	Herkunft	Sorte	Datum
53	Holstein	Atlanta	10. 8. 51
101	Hannover	Merkur	28. 9. 51
163	Oberbayern	unbekannt	27. 9. 52
188	Hannover	unbekannt	27. 6. 53
196	Oberpfalz	unbekannt	18. 7. 53

Im Zusammenhang mit der Isolierung von *A. solani* aus Blattflecken bedarf es eines Hinweises auf die in Abb. 14 dargestellten Symptome. Sie weichen vom üblichen Bilde des *A. solani*-Befalles durch den geringeren Umfang und die größere Zahl der Flecke je Blatt ab, werden aber häufig auf *A. solani* oder *A. tenuis* (KÖHLER, 1948; HEINZE, 1953) bezogen. In eigenen Versuchen waren aus derartig befallenen Blättern nur saprophytische Pilze,

darunter gelegentlich *A. tenuis*, zu isolieren. Bei Blattinfektionen mit *A. solani* entstand nie das hier beschriebene Erscheinungsbild.

Vier Herkünfte aus Kartoffelknollen fanden in Versuchen Verwendung, und zwar:

Nr.	Herkunft	Sorte	Datum
165	Hannover	Virginia	11. 11. 52
171	Westfalen	Virginia	18. 3. 53
172	Niedersachsen	Virginia	24. 3. 53
175	Schweiz	Bintje	10. 4. 53

Nur die Kartoffelblattherkünfte Nr. 53, 101, 163, 196 verursachten nach der Infektion Faulflecke an Kartoffelknollen.

b) Infektionsmethode und Anordnung der Versuche

Die Infektion der Knollen erfolgte nach der von Teschner (1951) entwickelten Methode; die dabei erhaltenen Krankheitsbilder entsprachen weitgehend denen natürlichen Befalls.

Die einzelnen Versuche wurden mit jeweils 10 Knollen durchgeführt, die an zwei stets an einer Längsseite nebeneinanderliegenden Stellen mit Myzelstückchen infiziert waren, um auf diese Weise 20 Infektionsstellen auswerten zu können. Auf die möglichst gleiche Plazierung der Infektionen wurde besonders geachtet; hierdurch sollten dem Pilz, unabhängig von den wechselnden stofflichen Gegebenheiten innerhalb der Knolle (z. B. Zuckergehalt: Müller-Thurgau, 1885), gleiche Entwicklungsbedingungen geboten werden. Das Impfmaterial stammte aus niedrigen, zwei bis drei Wochen alten und daher gut durchwachsenen Biomalz-Agarplatten, die Größe der Impfstückchen betrug etwa 3 mm^2.

Nach vergleichenden Infektionen an frisch geernteten Knollen im Herbst 1952 wählte ich die pathogene Blattherkunft Nr. 163 für die Reiheninfektionsversuche an Knollen aus.

Daneben versuchte ich auch Knollen mit Konidien zu infizieren, da diese Art der Übertragung vermutlich dem natürlichen Vorgang entspricht. Die Bildung von Sporen wurde nach

Abb. 14. Punktartige Blattnekrose unbekannter Herkunft

der Methode von KLAUS-NEERGAARD (NEERGAARD, 1945) erzielt: Zerschneiden eines flachen, gut durchwachsenen Nährbodens, Befestigung der Schnittstücke an der Innenseite des Petrischalendeckels, Einlegen feuchten Filterpapiers in die Schale. Verletzte und unverletzte Knollen wurden in Sporensuspensionen getaucht oder Wundinfektionen mit Konidienaufschwemmungen durchgeführt. Wie schon frühere Autoren (GOOSSENS, 1933; KLAUS, 1941) hatte auch ich aus vorerst unerklärlichen Gründen hierbei nur geringen Erfolg, der die Durchführung von Reiheninfektionen nicht zugelassen hätte.

c) Bonitierungsschema

Für die Bewertung des Infektionserfolges erwiesen sich Messungen der Faulflecke als unzweckmäßig, da sich die Fäule alternativ über die Oberfläche oder in das Innere der Knollen ausbreiten kann. Ich entwickelte daher ein den besonderen Bedingungen Rechnung tragendes Bonitierungsschema, das folgende fünf Stufen umfaßte:

0 Die Infektionsstelle bleibt unverändert;

1 das Gewebe ist nur innerhalb des Bereiches der geschnittenen Zunge eingesunken (Abb. 15);

2 um die Infektionsstelle hat sich ein kleiner Hof eingesunkenen Gewebes gebildet (Abb. 16);

3 der Faulfleck hat den engeren Bereich der Infektionsstelle überschritten, dringt aber nicht tiefer in das Knollenfleisch ein (Abb. 17),
oder: das braune Gewebe beginnt in stumpfem Winkel in die Knolle vorzudringen, die Oberflächenausbreitung entspricht aber Stufe 2 (Abb. 18);

4 der Faulfleck hat sich über etwa ein Viertel der Knollenoberfläche flach ausgebreitet (Abb. 19),
oder: der Pilz ist bis zum Knollenmittelpunkt vorgedrungen; meist ist ein Hohlraum entstanden. Das äußere Bild entspricht Stufe 2 oder 3 (Abb. 20).

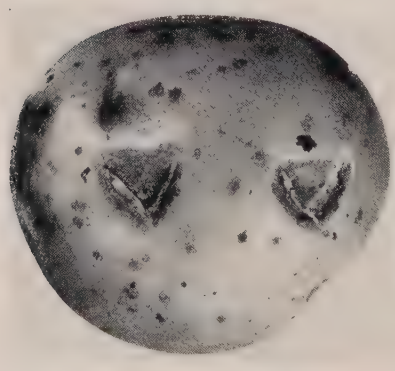

Abb. 15. Bonitierungsstufe 1

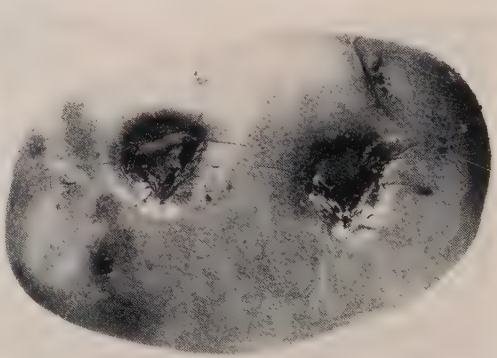

Abb. 16. Bonitierungsstufe 2

In diese fünf Stufen konnte ich die verschiedenen Ausbreitungsmöglichkeiten der Alternaria-Knollenfäule hinreichend sicher einordnen.

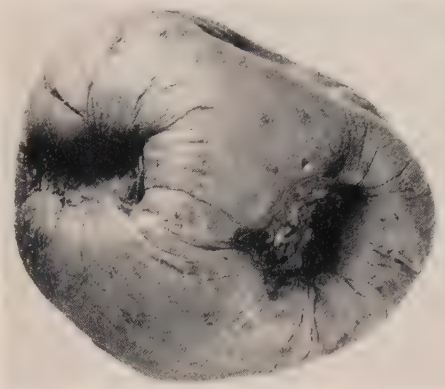

Abb. 17. Bonitierungsstufe 3, Flächenausbreitung

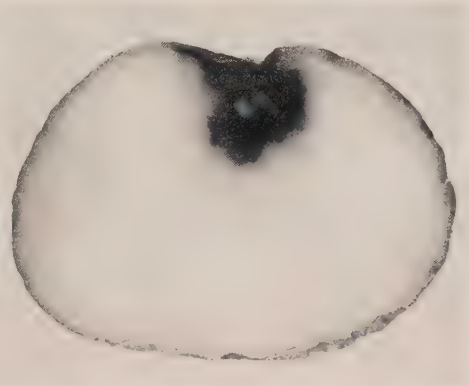

Abb. 18. Bonitierungsstufe 3, Tiefenausbreitung

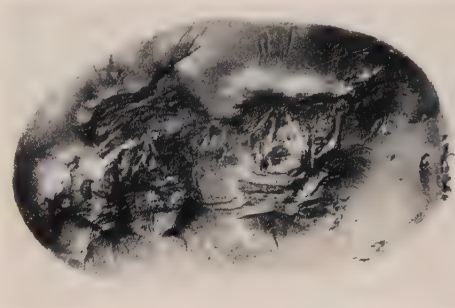

Abb. 19. Bonitierungsstufe 4, Flächenausbreitung

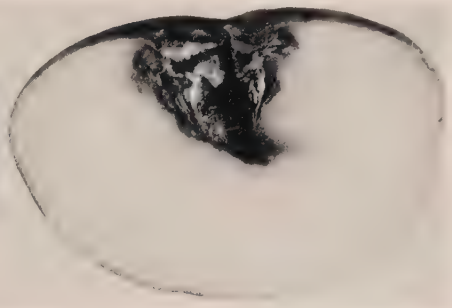

Abb. 20. Bonitierungsstufe 4, Tiefenausbreitung

2. Einfluß des Knollenalters auf die Entwicklung der Faulstellen von *A. solani*

Die Abhängigkeit des Infektionserfolges oder der Entwicklung der Alternaria-Faulstellen vom Alter der Knollen kommt in einigen früheren Arbeiten zum Ausdruck. Folsom und Bonde (1925) und Johansen (1948) infizierten mit Erfolg lediglich junge oder noch unreife Knollen. Weitergeführte Infektionsversuche (Gratz und Bonde, 1926) erbrachten positive Ergebnisse bis zu 20 Tagen nach der Ernte, während später keine Faulflecke mehr entstanden. Klaus (1941) erprobte verschiedene Infektionsmethoden und konnte generell nur bei frisch geernteten Knollen Symptome erzeugen. Teschner (1951) vertrat die Auffassung, daß die Keimruhe der Knolle für den Infektionserfolg ausschlaggebend sei, da sie nur kurz nach der Ernte und später erst nach Keimungsbeginn bis zum Mai Faulflecke erhielt.

Die Ergebnisse der zitierten Arbeiten wie auch gewisse Beobachtungen der Praxis ließen erwarten, daß die Ausbreitung der Alternaria-Fäule im Lager an das Alter der Knollen gebunden ist. Für die anzulegenden Versuche waren einige Voraussetzungen als gegeben anzusehen: Da eine Verbreitung des Erregers im Lager von Knolle zu Knolle offenbar nicht möglich ist (BERTRAM, 1939; GOOSSENS, 1937; TESCHNER, 1951), müssen natürliche Infektionen wohl vor oder während der Ernte erfolgen. Daher blieb, um die Frage nach der Altersabhängigkeit der Entwicklung der Alternaria-Knollenfäule einer Klärung näherbringen zu können, nur die Möglichkeit, in bestimmten Zeitabständen während einer Lagerperiode künstliche Infektionen durchzuführen und dabei zu unterstellen, daß sie sich ähnlich den natürlichen Infektionen entwickeln.

a) Infektionsversuche bei Lagerung im Keller

In den Versuchen 1952/53 fanden neun Kartoffelsorten Verwendung (Frühsorten: Vera, Deutsche Erstlinge, Frühmölle; mittelfrühe Sorten: Bona, Speisegold, Toni; Spätsorten: Magna, Capella, Alpha). Die Infektionen wurden am 20. 11. 52 bis 20. 5. 53 in Abständen von acht Wochen vorgenommen. Die Bonitierungen erfolgten monatlich und erfaßten nach dem ersten Infektionstermin einen Zeitraum von 24 Wochen, der etwa einer durchschnittlichen Lagerperiode entspricht. Temperaturen und relative Luftfeuchtigkeit des Lagerraumes wurden durch einen Thermohygrographen kontrolliert. Messungen, Infektions- und Bonitierungstermine sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Für jeweils vier Wochen ergibt sich aus den täglichen Ablesungen um 12.00 Uhr mittags der angegebene Mittelwert für Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit. Da der Kellerraum keine Tag- und Nachtschwankungen aufwies, erscheint diese Art der Berechnung zulässig.

Tabelle 1

Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit und Infektions- bzw. Bonitierungstermine im Versuch zur Ausbreitung der *Alternaria*-Knollenfäule nach künstlicher Infektion bei Kellerlagerung 1952/53

Beobachtungszeit	Temperatur °C	Relative Luftfeuchtigk.	Bonitierungs- bzw. Infekt.-Termine	Infektion	Bonitierung
20. 11. — 15. 12. 52	5	81 %	20. 11. 52	1.	1 a[1])
16. 12. — 19. 1. 53	4	84 %	16. 12. 52		
20. 1. — 23. 2. 53	4	85 %	20. 1. 53	2.	1 b; 2 a
24. 2. — 19. 3. 53	5	88 %	24. 2. 53		
20. 3. — 20. 4. 53	8	91 %	20. 3. 53	3.	2 b; 3 a
21. 4. — 19. 5. 53	10	85 %	21. 4. 53		
20. 5. — 18. 6. 53	13	85 %	20. 5. 53	4.	3 b; 4 a
19. 6. — 23. 7. 53	15	93 %	19. 6. 53		4 b
24. 7. — 20. 8. 53	17	94 %	20. 8. 53		

[1]) Bonitierung: a 4 Wochen nach Infektion, b 12 Wochen nach Infektion.

Die Ergebnisse des Reiheninfektionsversuches im Winter 1952/53 bei Lagerung im Keller sind aus Tabelle 2 ersichtlich und den Reifegruppen folgend für die einzelnen Sorten gesondert dargestellt. Die Zahlenwerte sind nach dem früher beschriebenen Schema ermittelt und geben den durchschnittlichen Entwicklungsstand der 20 Infektionsstellen an je 10 Knollen 4 bzw. 12 Wochen nach der Infektion wieder. Mit dieser zweimaligen Bonitierung ist die Ausbreitung der Alternaria-Fäule hinreichend erfaßt, da die Entwicklung der Faulflecke erst nach 4 und später 12 Wochen meßbar unterschieden, über 12 Wochen hinaus aber keine Zunahme mehr zu verzeichnen war. Die erhaltenen Werte wurden nach dem t-Test unter Berücksichtigung der Homogenität der Streuungen (LINDER, 1951) statistisch verarbeitet. Die mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit (P) von $< 5\,\%$, $< 1\,\%$ bzw. $< 0{,}1\,\%$ gesicherten Differenzen sind mit 1, 2 bzw. 3 Kreuzchen bezeichnet.

Vergleicht man die in Tabelle 2 unter a und b aufgeführten Werte waagerecht miteinander, so wird ersichtlich, daß vier bis zwölf Wochen nach der Infektion stets eine weitere Ausbreitung der Fäule erfolgte, die freilich in unterschiedlichem Maße von $P\%$ 0,1 bis 5 gesichert ist.

Bei sieben Sorten (Vera, Deutsche Erstlinge, Frühmölle, Toni, Magna, Capella und Alpha) breitete sich die Fäule nach jeder der vier Infektionen gleich stark aus; die senkrecht zu vergleichenden 4- und 12-Wochen-Werte der Bonitierung liegen innerhalb des Zufallsbereiches ($P\% > 5$). Nur die Sorte Frühmölle verhält sich insofern etwas anders, als bei ihr die erste Infektion gegenüber den folgenden eine stärkere Ausbreitung der Fäule auslöste.

Bei den Sorten Bona und Speisegold war nach den einzelnen Infektionsterminen zunehmend stärkere Faulstellenentwicklung zu erkennen. Die jeweilig erfaßte Vergrößerung der Faulstellen ließ sich (ausgenommen 2 a) bei Bona mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von $< 0{,}1$ bzw. $< 1\,\%$ sichern. Die Sorte Speisegold zeigte zwischen dem zweiten und dritten Bonitierungszeitpunkt vorübergehend stärkere Faulstellenentwicklung, die nur bei der a-Bonitierung zum Ausdruck kam ($P\% < 0{,}1$). Da die 12-Wochen-b-Bonitierung keine gleichsinnigen Resultate lieferten, muß gefolgert werden, daß der Pilz nach dem 20. 3. 53 nur kurzfristig günstigere Entwicklungsbedingungen fand.

Zur Erfassung der Anfälligkeitsunterschiede bei den Sorten prüfte ich varianzanalytisch die 12-Wochen-Bonitierungswerte aus Tabelle 2 (bei Gruppen mit gleicher Anzahl der Einzelwerte durch die Bestimmung der kleinsten gesicherten Differenz, bei ungleicher Anzahl der Einzelwerte durch paarweisen Vergleich unter Verwendung des Restfehlers; die Sorte Bona durfte in Anbetracht ihrer Sonderstellung unberücksichtigt bleiben).

Die Verarbeitung des Materiales (Tabelle 2 a und 2 b) läßt die geringe Anfälligkeit der Spätsorten gegen die Alternaria-Knollenfäule klar erkennen; es bestätigen 1. die gemeinsamen P-Werte von $>$ als 5 % für die Vergleiche der Spätsorten untereinander ihr gemeinsames Verhalten und 2. die Werte

Tabelle 2

Die durchschnittliche Entwicklung von *Alternaria solani* an Kartoffeln verschiedener Sorten bei Lagerung im Keller[1])
a 4 Wochen, b 12 Wochen nach künstlicher Infektion

Frühsorten

Vera	a	b[2])	Erstlinge	a	b	Frühmölle	a	b
1. Inf.	0,80	xxx 1,50	1. Inf.	0,60	xx 1,15	1. Inf.	1,70 xxx	xx 2,35
2. Inf.	0,55	xxx 1,50	2. Inf.	0,75	—	2. Inf.	1,00	xx 1,30
3. Inf.	0,70	xxx 1,50	3. Inf.	0,80	xx 1,10	3. Inf.	1,05	x 1,25
4. Inf.	0,65	xxx 1,90	4. Inf.	0,65	xx 1,25	4. Inf.	1,15	x 1,40

Mittelfrühe Sorten

Bona	a	b	Speisegold	a	b	Toni	a	b
1. Inf.	0,50	xxx 1,10 xxx	1. Inf.	0,60	xxx 1,65	1. Inf.	0,70	x 1,05
2. Inf.	0,65 xxx	xxx 2,05 xx	2. Inf.	0,85 xxx	x 1,35	2. Inf.	0,95	x 1,15
3. Inf.	1,60 xxx	xxx 2,85 xxx	3. Inf.	1,50↓	1,70	3. Inf.	0,90	xx 1,25
4. Inf.	2,75↓	xxx 4,00↓	4. Inf.	1,35	1,60	4. Inf.	0,70	xx 1,05

Spätsorten

Magna	a	b	Capella	a	b	Alpha	a	b
1. Inf.	0,05	xxx 0,55	1. Inf.	0,20	xx 0,65	1. Inf.	0,25	x 0,60
2. Inf.	0,05	xxx 0,65	2. Inf.	0,50	xx 0,90	2. Inf.	0,50	x 0,85
3. Inf.	0,05	xxx 0,70	3. Inf.	0,35	x 0,70	3. Inf.	0,25	x 0,60
4. Inf.	0,05	xxx 0,85	4. Inf.	0,35	xxx 0,90	4. Inf.	0,35	x 0,65

[1]) Lagerungsbedingungen siehe Tabelle 1.
[2]) Die nach dem t-Test ermittelte Überschreitungswahrscheinlichkeit (P) von $< 5\,\%$, $< 1\,\%$, $< 0{,}1\,\%$ ist durch x, xx, xxx jeweils zwischen den Werten für die verglichenen Infektions- bzw. Bonitierungszeitpunkte versinnbildlicht.

Tabelle 2a

Mittelwerte und Streuungen der 12-Wochen-Bonitierungen (b) aus Tabelle 2

Frühsorten		Mittelfrühe Sorten		Spätsorten	
Vera	1,600 ± 0,1000	Speisegold	1,575 ± 0,0777	Magna ...	0,688 ± 0,0625
Erstlinge .	1,167 ± 0,0500	Toni	1,125 ± 0,0479	Capella ..	0,788 ± 0,0658
Frühmölle	1,317 ± 0,0442			Alpha	0,675 ± 0,0595

Tabelle 2b

Differenzen und zugeordnete Sicherungen des statistischen Vergleiches der Werte aus Tabelle 2a

	Frühsorten			Mittelfrühe Sorten		Spätsorten		
	V	E	F	S	T	M	C	A
Vera	—	0,433	0,283	0,025	0,475	0,912	0,812	0,925
		+++	+	○	+++	+++	+++	+++
Erstlinge		—	0,150	0,408	0,042	0,479	0,379	0,492
			○	+++	○	+++	++	+++
Frühmölle ...			—	0,258	0,192	0,629	0,529	0,642
				+	○	+++	+++	+++
Speisegold...				—	0,450	0,887	0,787	0,900
					+++	+++	+++	+++
Toni					—	0,437	0,337	0,450
						+++	++	+++
Magna						—	0,100	0,007
							○	○
Capella							—	0,103
								○

○ = P % > 5, + = P % 1—5, ++ = P % 0,1—1, +++ = P % < 0,1.

aus den Vergleichen Spätsorten : mittelfrühe bzw. Frühsorten die geringere Anfälligkeit der Spätsorten. Die allgemeine Sicherung beträgt P% < 0,1; nur der Vergleich Capella : Deutsche Erstlinge bzw. Toni liefert Werte von < 1 %, die aber mit 0,13 bzw. 0,17 nahe der unteren Sicherungsgrenze liegen. Innerhalb der frühen und mittelfrühen Sorten sind keine gerichteten Einflüsse zu verzeichnen.

b) Versuche bei Lagerung im Klimaraum

Um die Reaktionsfolge im Wirt-Parasit-Verhältnis von Knolle und Pilz zu beschleunigen und auch den Einfluß der Temperatur studieren zu können, gelangten Versuche im Klimaraum zur Durchführung, die die Konstanthaltung von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit ermöglichen sollten. Bei der Wahl der Versuchstemperaturen waren die bislang in der Literatur niedergelegten Erfahrungen leitend.

Das Temperaturoptimum für das Wachstum des Erregers in vitro liegt nach mehrfachen Erfahrungen (Rands, 1917; Bonde, 1929; Klaus, 1941) zwischen 25 und 30 ° C. An der Knolle beobachtete Zacha (1948) das stärkste Fortschreiten der Fäule bei 24 bis 27 ° C, Gratz und Bonde (1926, 1927) und Klaus (l. c.), der allerdings mit Kartoffelscheiben arbeitete, dagegen bei 15 bis 16 ° C. Nach Gratz und Bonde (l.c.) entstanden bei 5 bis 7 ° C nur kleine, bei 25 ° C keine Faulflecke mehr.

Es erschien daher angezeigt, neben den Reiheninfektionsversuchen bei Kellerlagerung, die den praktischen Verhältnissen Rechnung trugen, gleiche Versuche bei konstanten Temperaturen von etwa 16 und 26 ° C anzulegen. Bei Temperaturen über 26 ° waren Infektionsversuche nicht möglich, da die geringe Haltbarkeit der Knollen eine Beobachtung des Pilzwachstums nicht mehr zuließ.

Die relative Luftfeuchtigkeit scheint für das Wachstum von *A. solani* allgemein nur geringe Bedeutung zu besitzen, da KLAUS (l. c.) weder in vitro noch bei Knolleninfektionen einen Einfluß erkennen konnte.

Beide Versuchsreihen befanden sich in dunklen Klimaräumen (Temperaturschwankungen: ± 3 °), die relative Luftfeuchtigkeit betrug 80 % (Schwankungen: ± 5 %) und dürfte damit den Verhältnissen von Kellerräumen entsprochen haben. In diesen Versuchen prüfte ich dieselben Sorten wie bei Kellerlagerung.

Bei 16 ° C zeigte sich vier Wochen nach der Infektion vom 20. 11. 1952 keine stärkere Ausbreitung der Fäule als in den oben erläuterten Lagerungsversuchen im Keller. Bedauerlicherweise war die weitere Entwicklung der Fäule bei 16 ° C wegen technischer Störungen der Klimaanlage nicht länger zu verfolgen, weshalb die Versuchsauswertung entfallen mußte.

Die Versuche bei 26 ° C und 80 % relativer Luftfeuchtigkeit konnten dagegen zu Ende geführt werden; die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt, wobei die Wiedergabe wie in Tabelle 2 gehandhabt ist und auf die dortigen Erläuterungen verwiesen werden kann. Nur die 12-Wochen-Bonitierung der ersten Infektion und beide Bonitierungen nach der vierten fielen infolge technischer Mängel der Klimaanlage aus.

Bei den 4-Wochen-Bonitierungen zeigen 6 Sorten (Frühmölle, Speisegold, Toni, Magna, Capella, Alpha) nach der zweiten Infektion gegenüber der ersten und dritten Infektion eindeutig geringere Entwicklung der Alternaria-Fäule; dabei lassen die Werte nach der ersten und dritten Infektion keine statistisch zu sichernden Unterschiede erkennen. Die Sorten Vera und Deutsche Erstlinge verfielen nach der ersten bzw. dritten Infektion Sekundärfäulen, so daß die geringere Anfälligkeit nach der zweiten Infektion nur im Vergleich zur ersten bei Vera und zur dritten bei Deutschen Erstlingen in Erscheinung tritt.

12-Wochen-Bonitierungen konnten nur nach der zweiten und dritten Infektion vorgenommen werden und zeigten nach der letzten die größeren Faulflecke.

Die geringeren Infektionserfolge nach dem zweiten Termin sind bei den Sorten Magna und Capella mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von < 1 %, bei den übrigen — abgesehen von Bona — mit $P\% < 0{,}1$ gesichert.

Die Sorte Bona zeigt ebenso wie in den Versuchen mit Kellerlagerung auch bei 26 ° ein abweichendes Verhalten. Während sich die Fäule im Keller stetig ausbreitete, wiesen die Bonitierungswerte im Klimaraum bei 26 ° C keine gesicherten Unterschiede auf.

Bei allen Sorten ist die augenscheinliche Ausbreitung zwischen den 4- und 12-Wochen-Bonitierungen statistisch nicht zu sichern, die Überschreitungswahrscheinlichkeit $P\%$ ist > 5. Daher lassen Infektionsversuche an Knollen bei warmer Lagerung (26 ° C) — im Gegensatz zur Kühllagerung — bereits nach vier Wochen eine bindende Beurteilung zu.

Tabelle 3

Die durchschnittliche Entwicklung von *Alternaria solani* an Kartoffeln verschiedener Sorten bei Lagerung im Klimaraum (Temperatur 26°C; relative Luftfeuchtigkeit 80%) nach künstlicher Infektion

Frühsorten

Vera	a	b	Erstlinge	a	b	Frühmölle	a	b
1. Inf.	↑2,70 xxx	—	1. Inf.	—	—	1. Inf.	↑2,75 xxx	—
2. Inf.	1,20	—	2. Inf.	1,50 xxx	1,85 xxx	2. Inf.	1,90 xxx	2,10 xxx
3. Inf.	—	—	3. Inf.	↓2,55	↓2,65	3. Inf.	↓2,75	↓3,05

Mittelfrühe Sorten

Bona	a	b	Speisegold	a	b	Toni	a	b
1. Inf.	1,25	—	1. Inf.	↑1,60 xxx	—	1. Inf.	↑2,10 xxx	—
2. Inf.	1,40	1,75	2. Inf.	0,80 xxx	1,00 xxx	2. Inf.	0,70 xxx	1,00 xxx
3. Inf.	1,65	1,90	3. Inf.	↓1,70	↓2,00	3. Inf.	↓1,70	↓2,15

Spätsorten

Magna	a	b	Capella	a	b	Alpha	a	b
1. Inf.	↑1,20 xx	—	1. Inf.	↑1,00 xx	—	1. Inf.	↑1,35 xxx	—
2. Inf.	0,55 xx	0,65 xx	2. Inf.	0,65 xx	0,95 xxx	2. Inf.	0,20 xxx	0,50 xxx
3. Inf.	↓1,30	↓1,50	3. Inf.	↓1,05	↓1,45	3. Inf.	↓1,30	↓1,60

Nach den Ergebnissen der Lagerungsversuche scheint *A. solani* auf der Sorte Bona bei 26° C bereits überoptimaler Temperatur ausgesetzt zu sein, da bei Kellerlagerung mit wesentlich niedrigeren Temperaturen ein zum Teil stärkeres Fortschreiten der Fäule zu beobachten war.

Zur Klärung dieser Beziehung infizierte ich am 10. 5. 53 je 20 Knollen der Sorten Bona und Frühmölle mit je zwei Infektionsstellen, lagerte bei 26 bzw. 21° C und bonitierte am 12. 6. 53. Den nachfolgend zusammengestellten Werten sind eingeklammert Parallelresultate aus den Tabellen 2 und 3 beigegeben.

Sorte	Temperatur (Keller)		
	26°	21°	10 — 13°
Bona	1,91 (1,65)	xxx 3,00	(2,75)
Frühmölle	2,86 (2,75)	xxx 1,15	(1,15)

Die Zahlen zeigen, daß bei der Sorte Bona mit einem gegenüber anderen Sorten abweichenden Temperaturoptimum für den Erreger zu rechnen ist, da sich die Fäule bei 21 ° C wesentlich stärker als bei 26 ° C auszubreiten vermochte, ja sogar die niederen Temperaturen des Kellerraumes zu größeren Faulstellen führten. Die Sorte Frühmölle dagegen zeigt bei 26 ° C den besten Infektionserfolg.

3. Folgerungen

Die Reiheninfektionsversuche bei Kellerlagerung (Tabelle 2), also unter Bedingungen, die praktischen Verhältnissen weitgehend entsprachen, zeigten für die geprüften Sorten — mit Ausnahme von Bona und bedingt Speisegold — eine nur geringe Ausbreitung der Alternaria-Knollenfäule während der Überwinterung. Die Bedingungen für den Erreger waren offenbar so ungünstig, daß eine eventuelle, altersgebundene Anfälligkeit der Knollen nicht in Erscheinung treten konnte.

Bei 26 ° C breitete sich die Fäule allgemein stärker aus als bei Kellerlagerung, dabei war der Infektionserfolg nach der ersten und dritten Infektion gleich hoch, nach der zweiten vergleichsweise geringer. Allerdings nahm die Sorte Bona in beiden Versuchen eine Sonderstellung ein, die besonderer Kennzeichnung bedarf.

Bei Kellerlagerung mit einem Temperaturanstieg von 4 bis 15 ° C erreichte die Fäule nach der letzten Infektion am Ende der Lagerperiode ihr Höchstmaß (vgl. Tabelle 2). Eine sprunghafte Vergrößerung der Faulflecke war zwischen der dritten und vierten b-Bonitierung am deutlichsten. Ähnlich verhielt sich auch Speisegold (Tabelle 2, 2 a), bei der kurzfristig die Faulstellenbildung beschleunigt war.

Im Klimaraum bei 26 ° C entwickelten sich die Faulflecke der Sorte Bona nach allen Infektionsterminen gleichmäßig (Tabelle 3); sie verhielt sich damit wie sieben der übrigen geprüften Sorten bei Kellerlagerung.

Die Gegenüberstellung der Werte aus beiden Versuchen (Tabelle 4) ist leider nur unvollkommen möglich; als Hauptursache dafür sind die zeitweiligen technischen Störungen der Klimaanlage des Institutes zu nennen.

Bei den Frühsorten Vera, Deutsche Erstlinge und Frühmölle bedingen die höheren Temperaturen nach allen Infektionsterminen — soweit der Vergleich möglich ist — eine beschleunigte Entwicklung der Faulflecke. Diese Tendenz kommt auch in den niedrigeren Werten nach der zweiten Infektion noch zum Ausdruck; die Differenzen der Bonitierungswerte beider Lagerungsweisen sind nach 4 und 12 Wochen mit $P\% < 0{,}1$ gesichert.

Die Spätsorten verhalten sich grundsätzlich wie die Frühsorten, nur ist bei den höheren Temperaturen der Infektionserfolg nach der zweiten Infektion so gering, daß die Werte beider Lagerungsweisen statistisch nicht oder nur schwach gesichert unterschieden sind.

Tabelle 4

Vergleich der Reiheninfektionsversuche von Tabelle 2 und 3

Sortenname		a		b	
		26°	Keller	26°	Keller
		Frühsorten			
Vera	1. Inf.	2,70 xxx	0,80	—	1,50
	2. Inf.	1,20 xxx	0,55	—	1,50
	3. Inf.	—	0,70	—	1,50
	4. Inf.	—	0,65	—	1,90
Erstlinge	1. Inf.	—	0,60	—	1,15
	2. Inf.	1,50 xxx	0,75	1,85	—
	3. Inf.	2,55 xxx	0,80	2,65 xxx	1,10
	4. Inf.	—	0,65	—	1,25
Frühmölle	1. Inf.	2,75 xxxx	1,70	—	2,35
	2. Inf.	1,90 xxxxx	1,00	2,10 xxx	1,30
	3. Inf.	2,75 xxxx	1,05	3,05 xxx	1,25
	4. Inf.	—	1,15	—	1,40
		Mittelfrühe Sorten			
Bona	1. Inf.	1,25 xxx	0,50	—	1,10
	2. Inf.	1,40 xxx	0,65	1,75	2,05
	3. Inf.	1,65	1,60	1,90 xxx	2,85
	4. Inf.	—	2,75	—	4,00
Speisegold	1. Inf.	1,60 xxx	0,60	—	1,65
	2. Inf.	0,80	0,85	1,00 x	1,35
	3. Inf.	1,70	1,50	2,00 x	1,70
	4. Inf.	—	1,35	—	1,60
Toni	1. Inf.	2,10 xx	0,70	—	1,05
	2. Inf.	0,70 x	0,95	1,00	1,15
	3. Inf.	1,70 xx	0,90	2,15 xx	1,25
	4. Inf.	—	0,70	—	1,05
		Spätsorten			
Magna	1. Inf.	1,20 xxx	0,05	—	0,55
	2. Inf.	0,55 x	0,05	0,65	0,65
	3. Inf.	1,30 xxx	0,05	1,50 xxx	0,70
	4. Inf.	—	0,05	—	0,90
Capella	1. Inf.	1,00 xxx	0,20	—	0,65
	2. Inf.	0,65	0,50	0,95	0,90
	3. Inf.	1,05 xxx	0,35	1,45 xxx	0,70
	4. Inf.	—	0,35	—	0,90
Alpha	1. Inf.	1,35 xxx	0,25	—	0,60
	2. Inf.	0,20	0,50	0,50	0,85
	3. Inf.	1,30 xxx	0,25	1,60 xxx	0,60
	4. Inf.	—	0,35	—	0,65

Bei den mittelfrühen Sorten zeigt Bona in den höheren Temperaturen zunächst (a-Bonitierungen nach erster und zweiter Infektion) die erwartete stärkere Fäulnis, während später eine Hemmung zu verzeichnen ist. Auch bei Speisegold ist im Klimaraum eine nur geringe Förderung durch die höheren Temperaturen eingetreten. Die Vergleichswerte aus Klimaraum und Keller sind statistisch nicht oder nur gering unterschieden. Die Sorte Toni zeigte bei Kellerlagerung nicht die bei Bona und Speisegold beobachtete sprunghafte Vergrößerung der Faulflecke, die Fäule schien sich aber bei 26 ° C geringer auszubreiten als auf den Früh- und Spätsorten; diese Beziehung läßt sich aus dem Grade der statistischen Sicherung erschließen.

Unter Berücksichtigung der aus der Literatur bekannten Untersuchungsergebnisse über die Entwicklung von Alternaria-Knolleninfektionen (einerseits Gratz und Bonde, 1926; Klaus, 1941; andererseits Zacha, 1948) und der eigenen hier erörterten Befunde kann die Vorstellung eines direkten Zusammenhanges von Knollenalter und Ausbreitung der Fäule keinesfalls aufrechterhalten werden, vielmehr reagieren die Kartoffelsorten unter dem Einfluß der Temperatur unterschiedlich auf *A. solani* als Parasiten bei nur sekundärer Bedeutung des Knollenalters. Danach lassen sich unter den Kartoffelsorten zwei Reaktionstypen unterscheiden:

A: Das Gros der hier geprüften Sorten bietet dem Pilz bei Temperaturen, die dem Optimum des Erregers in vitro entsprechen, die günstigsten Entwicklungsbedingungen, wenn als Ausdruck dafür die Größe der Faulflecke am Ende der Lagerung gewählt wird. Die Nähe des Temperaturoptimums für den Erreger deutet sich auf diesen Sorten dadurch an, daß um die Jahreswende ein Zeitraum nur geringen Fortschreitens der Fäule zu verzeichnen ist. Bei Lagerung in niedrigen Temperaturen entstehen nur kleine und praktisch unbedeutende Faulflecke.

B: Bei diesem Reaktionstyp lassen die Optimaltemperaturen des Erregers in vitro nur anfänglich größere Faulstellen entstehen als niedrigere Temperaturen, gegen Ende der Lagerung ist die Entwicklung gehemmt. Bei Kellerlagerung bleibt das Auftreten der Fäule unerheblich, solange etwa 10 ° C nicht überschritten werden. Die während der Überwinterung wechselnd starke Entstehung von Faulflecken, wie sie die Nähe des Temperaturoptimums des Erregers in vivo zu kennzeichnen scheint, ist jedenfalls unter 26 ° C zu erwarten.

Durch die Vorstellung der Reaktionstypen wird es möglich, die Ergebnisse anderer Autoren sowie der eigenen Versuche und die Beobachtungen der Praxis weitgehend zu verstehen.

Die Erwartung gleichbleibend geringer Faulstellenbildung bei anhaltend niedrigen Überwinterungstemperaturen ist für die Sorten Bona und Speisegold insoweit erfüllt, als vier Wochen nach dem ersten und zweiten Infektionstermin in der Tat nur kleine Faulstellen entstanden (Tabelle 2, 2 a). Erst nach den späteren Infektionsterminen ist bei ansteigenden Lagertemperaturen der sprunghafte Wechsel der Faulfleckenentwicklung erkenntlich, die allgemein auf die Nähe des Optimalbereiches für *A. solani* bei den Sorten hin-

weist. Es darf erwartet werden, daß bei Überwinterung der infizierten Knollen (des B-Typs) unter konstanten Temperaturen um 16 ° C die wechselhafte Faulstellenbildung zu erkennen gewesen wäre; in diese Richtung weisen die Beobachtungen, nach denen Bona bei 21 und sogar bei 10 bis 13 ° C stärker zur Fäule neigte als bei 26 ° C, wo für Frühmölle eindeutig das Optimum lag (s. S. 401). Eine Differenzierung der Reaktionstypen bei Zimmertemperatur kann nicht erwartet werden, weil ihre Optima von 26 bzw. etwa 16 ° C zu nahe liegen und daher beide um die Jahreswende weniger anfällig sind.

In diesem Sinne müssen die Ergebnisse der Infektionsversuche Teschners (1951) betrachtet werden, da sie die infizierten Knollen im Laboratorium lagerte und den Wechsel der Anfälligkeit feststellen konnte. Die Befunde von Gratz und Bonde (1926) und Klaus (1941), die 15 bis 16 ° C als optimal für den Erreger an Knollen ansehen, wurden zweifellos an B-Sorten gewonnen, während Zacha (1948), der 24 bis 27 ° C als optimal bezeichnet, sicherlich A-Sorten prüfte.

Das keineswegs einheitliche Verhalten der Sorten Bona, Speisegold und Toni, die nach diesen Untersuchungen zum B-Typ zu rechnen wären, läßt vermuten, daß in dieser Gruppe das Optimum für den Erreger nicht durch einen engen Temperaturbereich zu kennzeichnen ist. Es wäre auch verfrüht, den B-Typ mit den mittelfrühen Sorten zu identifizieren, da die geprüften neun Sorten das gegenwärtige Kartoffelsortiment keineswegs repräsentativ vertreten.

Auf die zu vermutenden physiologischen Grundlagen des Verhaltens der Sorten gegenüber *A. solani* wird in den folgenden Abschnitten eingegangen.

C. Einflüsse auf das Wachstum des Erregers in Beziehung zur Physiologie der lagernden Knolle

In den bisher geschilderten Versuchen stand das Verhalten der Knolle gegenüber dem Parasiten im Vordergrund der Betrachtung; dagegen soll nun versucht werden, das Wirt-Parasit-Verhältnis von der Seite des Erregers her zu beleuchten, ihn hierbei in einigen wesentlichen Eigenschaften kennenzulernen und sein Verhalten in Beziehung zur Physiologie der lagernden Kartoffelknollen zu sehen.

1. Methodisches

Das Erregermaterial bestand aus den bereits früher (S. 392) gekennzeichneten Tomatenfrucht-, Kartoffelblatt- und Kartoffelknollen-Herkünften.

Als Standardnährboden diente Biomalzagar (2 % Biomalz, 1,8 % Agar, pH 5,5). Im allgemeinen wurden die Versuche — wenn kein besonderer Vermerk gegeben wird — bei 26 ° C durchgeführt.

Zur Feststellung der Wachstumsgeschwindigkeit unter verschiedenen Bedingungen wurden 15 ccm des entsprechenden Nährbodens in Petrischalen

(d = 9 cm) gegossen. Das Zentrum der Platte beimpfte ich mit etwa 2 mm² großen, von Alternaria gut durchwachsenen Teilchen eines etwa 14 Tage alten Biomalz-Agarbodens. Das fortschreitende Wachstum kennzeichnete ich, da der Pilz nur langsam wuchs, in Abständen von zwei Tagen durch Umrandung der bewachsenen Zone auf der Unterseite der Schale mit Auszieh-tusche. Da der Pilz konzentrisch um die Infektionsstelle zu wachsen pflegt, erwies es sich als ausreichend, für die Auswertung jeweils drei Schalen heranzuziehen und auf die Planimetrierung der bewachsenen Fläche zu verzichten; sie ließ sich — in Anlehnung an BRÖMMELHUES (1935) — bei der einzelnen Schale durch den Längs- und Querdurchmesser, bei drei Schalen mit dem Mittelwert der gemessenen sechs Durchmesser bestimmen. Die in zeitlicher Folge ermittelten Bonitierungswerte waren nach Übertragung in ein Koordinatensystem für alle Versuche durch eine Gerade zu verbinden, womit der gleichbleibende Zuwachs ausgewiesen war. Die während der ersten zwei Tage nach den Impfungen bewachsene Fläche blieb bei der graphischen Ermittlung des durchschnittlichen Zuwachses außer acht, um eventuell Unterschiede des Anfangswachstumes auszuschalten.

Die Zuckergehaltsbestimmungen an Knollen wurden — prinzipiell der Methode von FEHMI (1933) folgend — nach diesem Arbeitsgang vorgenommen: Waschen und Abtrocknen von 10 Knollen; Vierteilung der Knollen durch Schnitte von der Krone zum Nabel; Zerreiben eines Viertels je Knolle mit sorgfältig gereinigter Glasreibe; Trocknung des Breies über Nacht bei 70 ° C; nach Pulverisierung der Substanz Trocknung von etwa 3 × 0,3 g Einwaage bis zur Gewichtskonstanz; Extraktion der löslichen Bestandteile mit 10 ccm Aqua dest. 1 Stunde bei 55 ° C; nach Filtrierung Auffüllung auf 100 ccm Aqua dest.; Bestimmung der direkt und indirekt reduzierenden Zucker nach der Methode von HAGEDORN und JENSEN (KLEIN, 1932).

2. Temperatur

Die früher beschriebenen Reiheninfektionsversuche unter den Lagerungsbedingungen des Klimaraumes hatten ergeben, daß auf Kartoffelknollen verschiedener Sorten nicht mit einem einheitlichen Temperaturoptimum für die Entwicklung des Erregers zu rechnen ist. Zur Ergänzung dieses Befundes schien es wünschenswert zu prüfen, wie sich eine Reihe von *A. solani*-Herkünften auf einheitlichem Substrat wechselnden Temperatureinflüssen gegenüber verhalten. Außerdem war in den Versuchen zur Feststellung der Wachstumsgeschwindigkeit die Herkunft 188 durch einen fast um das Doppelte erhöhten Wert bei 26 ° C aufgefallen, so daß eine nähere Analyse ihres Verhaltens in Temperaturversuchen erstrebenswert war.

Nach NEERGAARD (1945) liegt das Wachstumsoptimum von *Alternaria porri* mit ihren *formae speciales* übereinstimmend bei 27 ° C, eine Angabe, die durch SCHMIDT (1954) für die neu beschriebene Form *lallemantiae* bestätigt wird. Für *A. solani* fand BONDE (1929) das Temperaturoptimum zwischen 25 bis 30 ° C. Eingehendere Studien liegen von RANDS (1917) und

Klaus (1941) vor. Rands, der als Kriterium Zahl und Länge der gebildeten Keimhyphen wählte, legte die Kardinalpunkte der Wachstumskurve wie folgt fest:

Min.: 1 bis 2 ° C, Opt.: 26 bis 28 ° C, Max.: 37 bis 45 ° C.

Klaus bestimmte die Kurve durch die Mittelwerte zweier Herkünfte nach der Wachstumsrate auf Platten und errechnete das Optimum nach der Kettenlinie Janischs (1925):

Min.: 1 bis 2 ° C, Opt.: 26,1 ° C, Max.: 34,55 ° C.

Eigene Untersuchungen liefen mit fünf Herkünften (196, 172, 165, 163, 188) bei sieben Temperaturstufen: 4 °, 10 °, 16 °, 21 °, 26 °, 31 °, 36 ° C. Da es allein darauf ankam, eventuelle Herkunftsunterschiede zu ermitteln, konnten angesichts der bereits vorliegenden Ergebnisse die Temperaturstufen relativ weit gewählt werden.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 5 und Abb. 21 dargestellt und zeigen im wesentlichen Übereinstimmung mit den Daten von Rands, Klaus und Neergaard. Die fünf geprüften Herkünfte verhielten sich den ansteigenden Temperaturen gegenüber durchaus gleichartig; die Herkunft 188 nimmt insofern

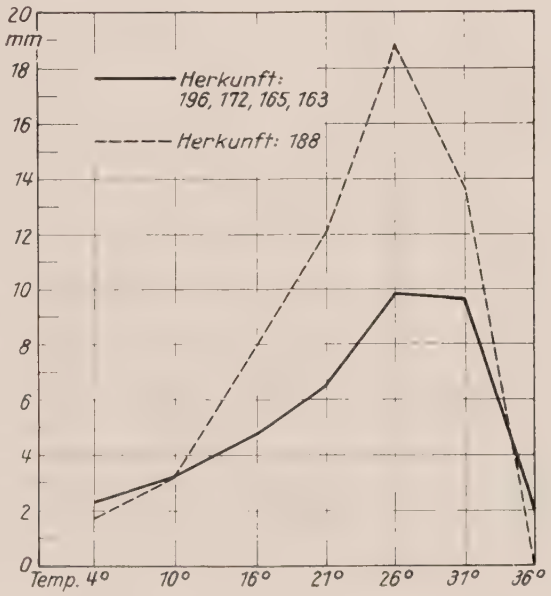

Abb. 21. Einfluß der Temperatur auf die Wachstumsrate (mm/2 Tage) einiger Herkünfte von *A. solani*

Tabelle 5

Wachstumsrate (mm/2 Tage) einiger Herkünfte von *A. solani* bei Temperaturen von 4 bis 36 ° C

(Nährboden: Biomalzagar, pH 5,5)

Temp.	1. 196	2. 172	3. 165	4. 163	M 1—4	5. 188
4 °	2,30	2,28	2,34	2,30	2,31	1,84
10 °	3,22	3,22	3,20	3,20	3,21	3,24
16 °	4,80	4,75	4,80	4,80	4,79	8,08
21 °	6,44	6,44	6,50	6,48	6,47	12,00
26 °	9,75	9,76	9,74	9,76	9,75	18,75
31 °	9,68	9,64	9,60	9,60	9,63	13,42
36 °	2,00	2,05	1,96	2,02	2,01	—

M = Mittelwert.

eine Sonderstellung ein, als sie zwischen 16 und 31 ° C erheblich schneller wuchs. Mit diesem Verhalten sind aber keine Pathogenitätseigenschaften verbunden, da 188 apathogen war, während die einzig pathogene Herkunft 163 in ihrem Verhalten der Mehrzahl entsprach.

In Verbindung mit den Ergebnissen der Reiheninfektionsversuche stützt dieses Resultat die Auffassung, daß weniger unterschiedliche Eigenschaften des Erregers als vielmehr temperaturabhängige Vorgänge in den Knollen das Ausmaß des Befalles durch Alternaria-Knollenfäule bestimmen.

3. Zuckergehalt

Infektionsversuche mit *A. solani* an lagernden Kartoffelknollen, die von früheren Autoren (vgl. C 2) innerhalb bestimmter Zeitabschnitte, von mir laufend während einer Lagerperiode durchgeführt wurden, lassen grundsätzlich erkennen, daß die Fäule zu Beginn und gegen Ende der Überwinterung beachtlich, in der Zwischenzeit nur geringfügig fortschreitet.

Teschner (1951), die als erste den Wechsel von geringerer zu stärkerer Ausbreitung der Fäule bei Winterausgang nachweisen konnte, begründete ihre Beobachtung mit einem Ansteigen des Zuckergehaltes der Knollen zu diesem Zeitpunkt; sie stützte sich dabei auf Schmidt (1929), der ähnliches bei Fusarium-Infektionen beobachtete und den Zuckergehalt deshalb für ausschlaggebend hielt, weil er an unterkühlten und daher zuckerreicheren Knollen (Müller-Thurgau, 1882; Wright, 1932) gleichsinnige Infektionsergebnisse erzielte. Diese Vermutung hat auch im Hinblick auf *A. solani* einige Wahrscheinlichkeit für sich, da die wichtigsten physiologischen Vorgänge in lagernden Knollen den Kohlenhydratstoffwechsel (Stärkeverzuckerung, Zuckerveratmung) betreffen, während die transpiratorische Verminderung des Wassergehaltes der Knollen nach Klaus (1941) das Wachstum von *A. solani* kaum beeinflussen dürfte.

Über den Zuckerhaushalt lagernder Kartoffelknollen liegen Untersuchungen mehrerer Autoren vor. Das Ansteigen des Glukose- und Saccharosegehaltes mit einer entsprechenden Stärkeabnahme im Laufe einer Lagerperiode ist als gesicherte Beziehung anzusehen (de Vries, 1878; Müller-Thurgau, 1882, 1885 a; von Eckenbrecher, 1912; Wright, 1932). Auch die Unterbrechung der Keimruhe mit Chemikalien hat eine Zuckeranreicherung zur Folge (Denny, 1929, 1930; Schulze und Fischnich, 1951; Irion und Fischnich, 1952), während die Behandlung mit keimhemmenden Stoffen zur Verminderung der reduzierenden Zucker führt (Dettweiler, 1952).

Für die Durchführung eigener Versuche kamen Infektionen an kühl gelagerten Knollen nicht in Betracht, da zur Erhaltung der so erzielten Saccharoseanreicherung niedrige Temperaturen notwendig gewesen wären, bei denen kein Wachstum des Erregers zu erwarten war; andererseits hätten höhere Temperaturen den Zuckerspiegel wieder absinken lassen. Die Verhältnisse für Fusariuminfektionen (Schmidt, 1929) mögen infolge des schnelleren Anfangswachstumes günstiger liegen.

Auch die Deutung von Versuchen in vitro mit dem Ziel, die Wirkung wechselnder Zuckergehalte auf den Erreger zu studieren, begegnet gewissen Schwierigkeiten. So fanden Darpoux et al. (1952) eine Beziehung zwischen Saccharosegehalt des Nährbodens und Farbstoffbildung, glaubten aber, die wechselnde Färbung sekundär entstehenden organischen Säuren und dem damit fallenden pH zuschreiben zu müssen. Klaus (1941) beabsichtigte, durch steigende Zuckergaben zu einem nicht näher beschriebenen Substrat den osmotischen Wert des Mediums zu beeinflussen, und beobachtete dabei oberhalb 22,5 % Zuckergehalt ein Nachlassen, bei 55 % kein Wachstum mehr. Infolge des eindeutigen Nährstoffcharakters von Rohrzucker wird wohl dahingestellt bleiben müssen, welche Einflüsse in diesem Fall für die Beeinträchtigung des Pilzwachstums entscheidend waren.

In eigenen Versuchen zum Studium der Wirkung steigender Zuckergehalte auf *A. solani* wurden einem Glukoseagar von 0 bis 20 % (2 % NH_4NO_3; 0,5 % $MgSO_4$; 1 % K_2HPO_4; 1,8 % Agar; Glukose) ansteigende Glukosegaben zugesetzt, da innerhalb dieser Konzentrationen mit noch ungestörter Nährstoffwirkung gerechnet werden konnte. Der pH-Wert wurde durch Pufferung ($NaOH : C_2H_4OH \cdot COOH$) annähernd konstant gehalten.

Eigenarten der Myzelbildung in diesen Versuchen verdienen besondere Beachtung: Im zuckerfreien Nährboden breitet sich ein fädig-dünnes, farbloses Myzel rasch über die ganze Platte aus. Schon bei 0,5 % Glukosegehalt vermindert sich das Längenwachstum merklich, das Myzel wird dichter und zeigt schwach graubraune Färbung. Abnahme des Längenwachstums und Zunahme der Farbintensität lassen sich bei Steigerung des Glukosegehaltes bis zu 8 % beobachten. Bei weiterem Anstieg ist bei gleichbleibender Myzelbeschaffenheit eine geringe Erhöhung der Wachstumsrate zu beobachten (Abb. 22).

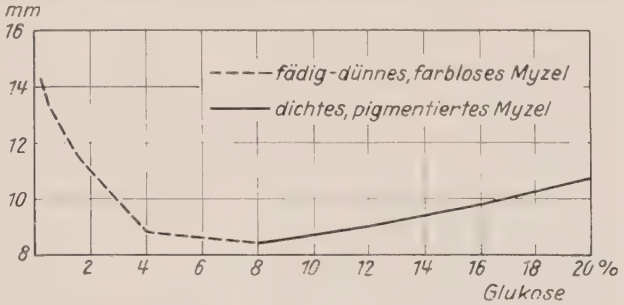

Abb. 22. Wachstumsrate (mm/2 Tage) von *A. solani* auf Glukoseagar bei steigenden Glukosegaben (0,5—20,0 %)

Ein weiterer Wachstumsvergleich mit *A. solani* erfolgte auf dem üblichen Glukoseagar mit 5 % Glukose und einem entsprechenden Nährboden mit 5 % Saccharose. Die durchschnittliche Wachstumsrate zweier Tage in Millimeter betrug für die geprüfte Herkunft 171 auf:

Glukoseagar : 12,46,
Saccharoseagar : 12,49.

Die Werte sprechen für die Ebenbürtigkeit des Mono- wie des Disaccharids als Nährstoffe für den Pilz.

Auf einem Nährboden, der als einzige Kohlenhydratquelle Stärke enthielt (1 % Kartoffelstärke, 0,02 % Asparagin, 0,075 % Magnesiumsulfat,

0,125 % primäres Kaliumphosphat, 1,8 % ausgewaschener Agar), war das gleiche fädig-dünne, farblose Myzel wie auf zuckerfreiem Medium zu beobachten.

Das beschleunigt wachsende, dürftige Myzel tritt auf zuckerfreiem und zuckerarmem Nährboden, bei sehr flachen Platten (ZACHA, 1948; eig. Beob.) und auch bei Ersatz von Zucker durch Stärke auf. Es ist daher berechtigt, diese Form als Hungererscheinung zu deuten; auch zeigt sich, daß Stärke von *A. solani* in vitro nicht abgebaut und als Kohlenhydratquelle ausgenutzt werden kann.

Tabelle 6

Zuckergehalte (%/Trockensubstanz) von acht Kartoffelsorten im November und Ergebnisse einer gleichzeitigen Infektion mit *A. solani*

(Zuckerbestimmung nach der Methode von HAGEDORN und JENSEN)

Sorte	I	II	III
Toni	1,377 ± 0,0091	1,653 ± 0,0091	1,05
Frühmölle	1,307 ± 0,0292	1,763 ± 0,0297	2,35
Erstlinge	1,540 ± 0,0153	2,243 ± 0,0187	1,15
Vera	1,780 ± 0,0208	2,333 ± 0,0220	1,50
Capella	1,990 ± 0,0058	2,560 ± 0,0153	0,65
Alpha	2,200 ± 0,0400	2,635 ± 0,0245	0,60
Speisegold	2,433 ± 0,0235	2,643 ± 0,0241	1,65
Bona	2,747 ± 0,0262	3,270 ± 0,0265	1,10

I Direkt reduzierende Zucker.
II Nach Inversion reduzierende Zucker (Gesamtzucker).
III Bonitierung der *Alternaria*-Fäule 12 Wochen nach der Infektion und Analyse (Kellerlagerung Tabelle 2; Bonitierungsschema Seite 394).

Statistischer Vergleich des Gesamtzuckergehaltes der Sorten:
P % > 5: Alpha : Speisegold; Alpha : Capella.
P % < 5: Erstlinge : Vera; Speisegold : Capella.
P % < 1: Frühmölle : Toni.
P % < 0,1: Alle übrigen Vergleiche.

Zuckeranalysen an Knollen von acht Sorten, die gleichzeitig in Infektionsversuche einbezogen waren, ergaben Schwankungen des Zuckergehaltes von 1,653 % bis 3,270 % der Trockensubstanz. Die Ergebnisse der chemischen Untersuchung sind in Tabelle 6 mit den Resultaten einer gleichzeitigen Knolleninfektion bei Bonitierung nach 12 Wochen vereinigt und zeigen keine Beziehung zwischen dem Gesamtzuckergehalt und der Ausdehnung der Faulflecke bei den einzelnen Sorten. Die statistische Bearbeitung der Analysenergebnisse weist in der Mehrzahl sorteneigentümliche Unterschiede des Zuckergehaltes nach; nur zwischen den Sorten Alpha und Capella bzw. Speisegold war P% > 5.

D. Diskussion

Auf Grund der vorstehenden Versuchsergebnisse seien zunächst die Beziehungen zwischen Knolle und Pilz als Wirt und Parasit diskutiert, um dann zu den durch die Alternaria-Knollenfäule aufgeworfenen praktischen Fragen,

besonders des geheimen Mangels (Frankfurter Kartoffel-Geschäftsbedingungen 1950, § 12, Absatz 7) Stellung zu nehmen.

Infektionen von *A. solani* an Kartoffelknollen sind je nach Sorte und Alter durch die Lagertemperatur zu beeinflussen. Die Ausbreitung der Infektionsstellen auf Spätsorten bleibt geringer als bei frühen und mittelfrühen Sorten. Hierbei mag die bisherige Deutung für das geringere Auftreten von Feldinfektionen bei Spätsorten im Sinne einer Befallsresistenz (GÄUMANN, 1951) Gültigkeit besitzen. Die Ergebnisse der Infektionsversuche an lagernden Knollen lassen sich nur durch die Annahme einer Ausbreitungsresistenz (GÄUMANN, l. c.) verstehen, da Infektionen mit der gleichen Erregerherkunft auf frühen und mittelfrühen Sorten zu ansehnlichen, auf Spätsorten aber nur zu kleinen Faulflecken führen.

Die Lagerung infizierter Knollen mußte, um altersgebundene Reaktionen nachzuweisen, bei konstanten Optimaltemperaturen für den Erreger (26 ° C) vorgenommen werden. Dabei breiteten sich die Infektionen innerhalb eines Zeitraumes vor und nach der Jahreswende vergleichsweise geringfügig aus. Anfang und Ende dieser Phase waren terminmäßig zwar nicht erfaßbar, jedoch liegt der Gedanke an eine Beziehung zur Keimruhe nahe. Die Inaktivierung der physiologischen Vorgänge in der Knolle, die auch bei höheren Temperaturen erhalten bleiben soll (SCHULZE und FISCHNICH, 1951), könnte den Infektionserfolg beeinflussen; keimhemmende Stoffe, die nach HEMBERG (1947, 1949, 1952) in der Schale lokalisiert sein sollen, werden für das Fortschreiten der Infektionen wohl nicht von Bedeutung sein. Die hier angedeuteten Probleme bedürfen ohne Frage noch weiterer Bearbeitung; so bleibt der Zusammenhang zwischen der geringeren Anfälligkeit der Knolle gegenüber *A. solani* und der Keimruhe noch eingehender nachzuweisen.

Die Temperatur des Lagerraumes beeinflußt den Infektionsverlauf bei den Sorten nicht gleichsinnig. Wohl entwickelt sich bei der Mehrzahl der Sorten die Fäule im Wachstumsoptimum des Pilzes in vitro am stärksten; bei einigen Sorten beobachtete ich aber die größte Ausbreitung bei Temperaturen, die wesentlich niedriger lagen (etwa 16 ° C). Damit klärt sich der bis dahin bestehende Widerspruch auf, der darin bestand, daß GRATZ und BONDE (1926) und KLAUS (1941) das Befallsoptimum für Knollen bei 15 bis 16 ° C fanden, ZACHA (1948) dagegen 24 bis 27 ° C ermittelte. Die Ursache dieser Verschiebung des Befallsoptimums an Knollen diskutierte KLAUS (l. c.) an Hand eigener und fremder Arbeitsergebnisse (APPEL, 1906; PRIESTLEY und WOFFENDEN, 1923; ARTSCHWAGER, 1927; LONGRÉE, 1932). KLAUS hält, da er mit unverletzten Knollen arbeitete, die Bereitschaft der Knolle zur Lentizellenverkorkung bei Alternaria-Befall für entscheidend, will aber für die Ausbreitung des Pilzes im Knollengewebe die Stärke der gebildeten Korkschicht verantwortlich machen, obwohl er eingangs das besonders hohe Vermögen der Alternaria-anfälligen Sorte Erstlinge zur Wundperidermbildung betont. Weiter vermutet er eine Begünstigung des Pilzes durch die im Bereich peridermbildender Zellen eintretende Ansäuerung des Gewebes (PRIESTLEY und WOFFENDEN, 1923); hiervon muß aber gerade eine Hemmung erwartet

werden, da nach DARPOUX et al. (1952) und eigenen Befunden erst leicht alkalische pH-Werte das Pilzwachstum (in vitro) begünstigen. Die Wundperidermbildung kann nach meinen Versuchen nicht zur Erklärung unterschiedlichen Befalles der Sorten durch *A. solani* herangezogen werden. Bei Bona ist im Befallsoptimum von etwa 16 ° C die Fäule bereits erheblich weiter fortgeschritten als auf den anderen Sorten bei 26 ° C, hat also schon bei der niedrigeren Temperatur eine echte Förderung erfahren. Da sich bei der Mehrzahl der Sorten Befallsoptimum und Wachstumsoptimum des Erregers in vitro bei 26 ° C entsprechen, kann ein Einfluß der Wundverkorkung auf die Ausbreitung des Pilzes nicht angenommen werden.

Die temperatur- bzw. altersabhängigen stofflichen Veränderungen in der Knolle betreffen in erster Linie die Kohlenhydrate, die ja den Trockensubstanzgehalt wesentlich bestimmen. Die Stärke selbst dürfte als Nahrungsquelle für den Pilz ohne Bedeutung sein; ihr Gehalt in der Knolle nimmt während der Überwinterung ab, und auch Versuche in vitro zeigten, wie wenig sie — als einziges Kohlenhydrat geboten — das Pilzwachstum fördern kann. Der Abnahme des Stärkegehaltes der Knollen während der Winterlagerung entspricht eine Zunahme namentlich des Glukose- und Saccharosegehaltes. Belege für eine Beziehung zwischen ihrem Anstieg und der Förderung des Pilzwachstums ließen sich durch die angestellten Versuche und Beobachtungen nicht erbringen. Die Zuckerwerte chemischer Analysen bei acht Sorten entsprechen der jeweiligen Anfälligkeit nicht; in vitro wurde das Wachstum erst durch Zuckergaben gefördert, die den Gehalt der Knollen weit überschritten. Nicht zuletzt ist auch zu berücksichtigen, daß die Entwicklung des Pilzes merklich bei Temperaturen beschleunigt wird, in denen der gebildete Zucker von den Knollen laufend veratmet oder für den Aufbau der Keimsubstanz verbraucht wird.

Für die Temperaturabhängigkeit des Alternaria-Befalles lagernder Knollen darf der eventuelle Einfluß der Stärke des Zuckerbildungsprozesses zur Zeit der Keimung nicht übersehen werden; Sortenunterschiede lassen sich aber hiermit keinesfalls erklären. Damit wird die Frage aufgeworfen, ob etwa die zweite, umfangreichere Stoffgruppe der stickstoffhaltigen Verbindungen befallsbeeinflussend wirken kann. Hierüber liegen bisher lediglich Untersuchungen an braunfaulen Kartoffeln vor (LEPIK, 1940; HAGENGUTH und GRIESINGER, 1941; ALTEN und ORTH, 1941). Dabei haben sich noch keine klaren Beziehungen zwischen dem Gehalt der Knollen an N-haltigen Verbindungen und der Sortenanfälligkeit gegen *Phytophthora infestans* herausarbeiten lassen.

Als Voraussetzungen für die Ausbreitung des Pilzes in der Knolle lassen sich nun die wesentlichsten Punkte präzisieren. Auf Seiten des Parasiten ist die Pathogenität Bedingung, eine Eigenschaft, die sich bis heute nur im Infektionsversuch zu erkennen gibt. Sie war in meinem Material ausschließlich den Blattherkünften eigen; da die Pathogenität aber auf anderem Substrat verloren werden kann, liegt die Vermutung nahe, daß der Pilz der Besiedelung des Blattes eine Eigenschaft verdankt, die er autonom nicht erhalten kann.

Die Knolle als Wirt ist vor dem Erreger größtenteils thermisch geschützt, da für die merkliche Ausbreitung der Fäule höhere Temperaturen erforderlich sind. Welche Faktoren auf Seiten der Knolle den Parasiten begünstigen, ist schwer zu beurteilen. Das Phänomen der stärksten Ausbreitung der Fäule bei noch suboptimalen Temperaturen für den Pilz wird sich kaum durch die Analyse der Kohlenhydrate und N-Verbindungen klären lassen. Über einen natürlichen Infektionsschutz scheint die Knolle allein in der Keimruhe zu verfügen; die Ursachen stehen aber eher mit der allgemeinen Herabsetzung der Stoffwechseltätigkeit als mit der Wirkung knolleneigener Hemmstoffe in Verbindung.

Der Begriff des geheimen Mangels im Sinne der Kartoffelgeschäftsbedingungen (Frankfurter Bedingungen 1950) bezieht sich auf bestimmte Mängel an Pflanzkartoffeln, die sich erst im Winterlager, bei der Vorkeimung oder während des Wachstums im Felde feststellen lassen und vom Verkäufer zu vertreten sind (§ 12, Abs. 7). Es handelt sich dabei ausschließlich darum, dem Käufer die Möglichkeit zu geben, Ersatzansprüche geltend zu machen. Ergänzenden Ausführungen zu den Frankfurter Bedingungen von Braun (1952) ist allerdings die Auffassung zu entnehmen, einen geheimen Mangel dann als gegeben anzusehen, wenn Pflanzgut ohne erkennbare Krankheiten im Herbst in das Lager gelangt, später aber als krank entnommen werden muß; hierbei bleibt die Frage der Leistung von Ersatzansprüchen außer Betracht.

Unter Berücksichtigung dieser Definitionen muß die Alternaria-Knollenfäule als geheimer Mangel eine verschiedene Wertung erfahren, da sie je nach den gegebenen Verhältnissen früher oder später auftreten kann.

Der Befall kann nach Goossens (1937) und eigenen Beobachtungen bereits bei der Ernte erkennbar sein und dann nicht als geheimer Mangel angesprochen werden.

An symptomlos eingelagerten Knollen kommt bei Einhaltung von Temperaturen unter 10 ° C kein oder nur so unbedeutender Befall zustande, daß er in der Praxis stets unbemerkt bleiben wird. Bei ansteigenden Temperaturen, namentlich im Frühjahr, kann sich die Fäule auf bestimmten Sorten (z. B. Bona) erheblich ausbreiten; in Vorkeimräumen besteht auch für die Sorten mit dem Befallsoptimum bei 26 ° C Gefahr (10 von 31 Beanstandungen, Frühjahr 1949). Im Sinne von Braun (1952) wäre in diesen Fällen die Fäule wohl als geheimer Mangel zu werten; den Kartoffelgeschäftsbedingungen folgend liegt jedoch kein geheimer Mangel vor, da Möglichkeiten zu Prognose und Bekämpfung der Krankheit noch nicht bestehen und daher die Haftpflicht des Anbauers nicht begründet werden kann.

Als befallsverhindernde Maßnahmen nach der Ernte können vorerst empfohlen werden: Aussortierung kranker Knollen, da sie durch Folgeparasiten befallen und in ihrem Pflanzwert gemindert werden können; Einhaltung von Lagertemperaturen unter 10 ° C, bei denen mit einem Fortschreiten des Befalles nicht zu rechnen ist; ständige Kontrolle des Pflanzgutes in Vorkeimräumen.

Zusammenfassung

1. Die Alternaria-Knollenfäule kann alternativ in zwei Symptombilder übergehen. Einer relativ großen Ausdehnung an der Oberfläche entspricht dabei nur eine geringe Tiefenausbreitung; kleinen Schalenflecken kann bis zur Knollenmitte fortschreitende Fäulnis zugeordnet sein. Hierbei können leicht Folgeparasiten Fuß fassen und die Vernichtung der Knollen vollenden.
2. Zu Verwechslungen mit der Alternaria-Knollenfäule können einige andere Schadbilder führen:
   a) Eine Knollennekrose der Sorte Deutsche Erstlinge, der wahrscheinlich eine physiologische Störung zugrunde liegt.
   b) Die Phoma-Trockenfäule, die im Anfangsstadium durch kreisrunde Form der Faulflecken, in fortgeschrittenem Stadium nur von Alternaria-Fäule mit Tiefenausbreitung im Befallsbild zu unterscheiden ist.
   c) Kleine, eingesunkene Schalenflecke, die sicherlich als Vergiftungserscheinungen gelten und auf das „pit-rot" der englisch-amerikanischen Literatur bezogen werden können.
3. Nach Reiheninfektionen mit anschließender Lagerung im Keller (bei ansteigenden Temperaturen von 5 bis 15 ° C) breitete sich die Fäule im allgemeinen geringfügig aus. Bei Lagerung im Klimaraum (26 ° C) erreichten die Faulflecke größere Ausmaße; um die Jahreswende war aber die Ausbreitung der Fäule vergleichsweise gering.
4. Unter den geprüften Sorten lag für sechs (Vera, Deutsche Erstlinge, Frühmölle, Magna, Capella, Alpha) das Befallsoptimum entsprechend dem Optimum des Erregers in vitro bei 26 ° C. Bei drei Sorten deuten die Befunde darauf hin, daß das Befallsoptimum tiefer (um 16 ° C) liegen muß. Hiermit konnte der bisher in der Literatur bestehende Widerspruch, demzufolge als Befallsoptimum an Knollen sowohl 15 bis 16 ° C als auch 24 bis 27 ° C bezeichnet wurden, der Klärung zugeführt werden, da mit sortentypischen Unterschieden zu rechnen ist. Die erfahrungsgemäß geringe Anfälligkeit der Spätsorten ließ sich experimentell bestätigen.
5. Unter den Herkünften des Erregers waren allein Kartoffelblattherkünfte (für Knollen) pathogen, die Kartoffelknollen- und Tomatenfrucht-Herkünfte apathogen.
6. Der Zuckergehalt der Knollen steht offenbar nicht in Beziehung zur Anfälligkeit der Sorten gegenüber *A. solani*. In vitro steigerten das Wachstum erst Zuckergaben, die den Knollengehalt wesentlich überschreiten. Für die spontane Ausbreitung von Alternaria-Knolleninfektionen dürften nicht altersgebundene, sondern in erster Linie temperaturabhängige Vorgänge entscheidend sein.
7. Bei ansteigenden Lagertemperaturen im Frühjahr und in Vorkeimräumen kann die Alternaria-Knollenfäule erheblich auftreten. Nach den

gültigen Kartoffelgeschäftsbedingungen ist ihre Wertung als geheimer Mangel nicht möglich, da die Vertretbarkeit durch den Verkäufer nicht begründet werden kann. Als befallsverhindernde Maßnahmen im Lager kommen nur die Einhaltung von Temperaturen unter 10° C und die Überwachung des Pflanzengutes in den Vorkeimräumen in Betracht.

Literaturverzeichnis

Alcock, N. L. und Foister, C. E., 1936: A fungus disease of stored potatoes. Scot. J. Agric. **19**, 3, 252—257.

Alten, F. und Orth, H., 1941: Untersuchungen über den Aminosäuregehalt und die Anfälligkeit der Kartoffel gegen die Kraut- und Knollenfäule (*Phytophthora infestans* de By.). Phytopath. Z. **13**, 243—271.

Appel, O., 1906: Zur Kenntnis des Wundverschlusses bei Kartoffeln. Ber. Dt. Bot. Ges. **24**, 118—122.

Artschwager, E., 1927: Wound periderm formation in the potato as affected by temperature and humidity. J. agric. Res. **35**, 995—1000.

Bertram, L., 1939: Die Alternaria-Knollenfäule der Kartoffel. Kranke Pflanze **16**, 26—32.

Bonde, R., 1929: Physiological strains of *Alternaria solani*. Phytopathology **19**, 533—548.

Braun, H., 1934: Pfropfenbildung der Kartoffelknolle. Z. Pflanzenkrankh. **44**, 24—35.

— —, 1935: *Alternaria solani* als Parasit der Kartoffelknolle. Nachr.-Bl. Dtsch. Pfl.Dienst **15**, 109—111.

— —, 1938: Minderung des Pflanzkartoffelwertes durch Befall mit *Alternaria solani*. Nachr.-Bl. Dtsch. Pfl.Dienst **18**, 105—106.

— —, 1952: Die Bewertung von Krankheiten in den Frankfurter Bedingungen. Kartoffelbau **3**, 183—184.

— —, 1952 a: Der Pflanzgutwert von Alternaria-kranken Kartoffelknollen. Kartoffelbau **3**, 94—96.

— —, 1953: „*Phoma foveata*", Erreger einer Knollenfäule. Kartoffelwirtschaft **6**, 419 bis 421.

— — und Voss, Th., 1954: Die Phoma-Trockenfäule der Kartoffel. Kartoffelbau **5**, 15—17.

Brömmelhues, M., 1935: Die wechselseitige Beeinflussung von Pilzen und die Bedeutung der Pilzkonkurrenz für das Ausmaß der Schädigung an Weizen durch *Ophiobulus graminis* Sacc. Zbl. Bakt., Abt. II, **92**, 81—116.

Darpous, H., Faivre-Amiot, A., Ridé, M. et Roux, L., 1952: Étude des propriétés antagonistes et de quelques produits du métabolisme d'une souche d'*Alternaria solani* (E et M) Jones et Grout. Ann. Epiphyt., Sér. C., **3**, 423—487.

Denny, F. E., 1929: Chemical changes indicated in potato tubers by treatments that break the rest period. Amer. J. Bot. **16**, 326—337.

— —, 1930: Sucrose and starch changes in potatoes treated with chemicals that break the rest period. Amer. J. Bot. **17**, 806—817.

Dettweiler, Ch., 1952: Zusammenhänge zwischen Austreiben und Atmung bei der Kartoffelknolle. 1. Mitteilung: Die Hemmung des Austriebes durch Fermentinhibitoren, insbesondere Urethane. Planta **41**, 214—239.

Eckenbrecher, G. v., 1912: Ergebnisse der Aufbewahrung von Kartoffeln in Mieten und im Kühlhause. Z. Spiritusind. Ergänzungsh. **2**, 1—14.

Ehrke, G., 1935: Untersuchungen über Stoffwechselvorgänge in eisenfleckigen Kartoffeln. Angew. Bot. **17**, 453—483.

— —, 1935 a: Eisenfleckigkeit bei Kartoffeln. Beobachtungen über den Einfluß eisenfleckigen Pflanzgutes auf Gesundheitszustand des Kartoffelnachbaues. Mitt. Landw. **50**, 463—464.

Fehmi, S., 1933: Untersuchungen über den Einfluß der Ernährung auf die Empfänglichkeit der Kartoffelknolle für Lagerparasiten und die Änderung des enzymatischen Stoffwechselverlaufes während der Lagerung. Phytopath. Z. **6**, 643—688.

Foister, C. E., 1940: Dry rot diseases of potatoes. Scot. J. Agric. **23**, 1, 63—67.

— —, 1952: The distribution and prevalence of potato gangrene. Plant Pathology **1**, 85—86.

Folsom, D. und Bonde, R., 1925: *Alternaria solani* as a cause of tuber rot in potatoes. Phytopathology **15**, 282—286.

Frankfurter Bedingungen, 1950: Richtlinien für die Geschäftsbedingungen beim Geschäftsverkehr mit Kartoffeln. Hamburg.

Gäumann, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. Basel.

Goossens, J., 1933: Alternaria-Droogrot van aardappelknollen. Tijdschr. over Pl.ziekt. **39**, 165—172.

— —, 1937: Aantastingen van aardappelknollen van het ras Bintje door *Alternaria solani* in verband met beschadigingen an den rooidatum. T. over Pl.ziekt. **43**, 266—277.

Gratz, L. O. und Bonde, R., 1926: Alternaria tuber rot of potatoes. Phytopathology **16**, 68.

— —, — —, 1927: Infection of potato tubers by *Alternaria solani* in relation to storage conditions. Maine Agric. Exper. Stat. Bull. **187**, 167—182, zit. nach Rev. appl. Myc. **8**, 124, 1929.

Hagenguth, K. und Griesinger, R., 1941: Untersuchungen über den Stickstoffhaushalt der Kartoffelknolle bei der Phytophthora-Fäule. Phytopath. Z. **13**, 517—529.

Hemberg, T., 1947: Studies of auxins and growth-inhibiting substances in the potato tuber and their significance with regard to rest period. Acta. Hort. Berg. **14**, 133—220.

— —, 1949: Significance of growth inhibiting substances and auxins for the rest period of the potato tuber. Physiol. Plant. **2**, 24—36.

— —, 1950: The effect of Glutathione on the growth-inhibiting substances in resting potato tubers. Physiol. Plant. **3**, 17—21.

— —, 1952: The significance of the acid growth-inhibiting substances for the restperiod of the potato tubers. Physiol. Plant. **5**, 115—129.

Irion, W. und Fischnich, O., 1952: Über stoffliche Umwandlungen in „Rindite" behandelten Knollen in den einzelnen Phasen der Keimung. Z. Pflanzenernähr., Düngg. u. Bodenkde. **59**, 248—266.

Janisch, E., 1939: Wo liegt das Temperaturoptimum bei Pilzen (*Aspergillus niger*)? Zbl. Bakt., Abt. II, **101**, 120—138.

Johansen, G., 1948: Kartoffel-Bladpletsyge (*Alternaria solani*). Soertryk of Statens plante patologiske Forsøg Maanedsoversigt **295**, 9—13.

Klaus, H., 1941: Untersuchungen über *Alternaria solani* Jones et Grout, insbesondere über ihre Pathogenität an Kartoffelknollen in Abhängigkeit von den Außenfaktoren. Phytopath. Z. **13**, 126—195.

Klein, G., 1932: Handbuch der Pflanzenanalyse. **2**. Bd., 1. Teil. Wien.

Lepik, E., 1940: Untersuchungen über den Biochemismus der Kartoffelfäulen. II. Über die Rolle der stickstoffhaltigen Bestandteile der Kartoffelknolle bei der Phytophthorafäule. Phytopath. Z. **12**, 292—306.

Linder, A., 1951: Statistische Methoden. Basel.

Longreé, K., 1932: Untersuchungen über die Ursache des verschiedenen Verhaltens der Kartoffelsorten gegen Schorf. Arb. Biol. Reichsanst. **19**, 285—336.

Müller-Thurgau, H., 1882: Über Zuckeranhäufungen in Pflanzenteilen infolge niederer Temperaturen. Lw. Jb. **11**, 751—828.

— —, 1885: Beitrag zur Erklärung der Reifeperiode bei Pflanzen. Lw. Jb. **14**, 851—907.

— —, 1885 a: Über die Natur des in süßen Kartoffeln sich vorfindenden Zuckers. Lw. Jb. **14**, 909—912.

Neergaard, P., 1945: Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*, taxonomy, paratism, economical significance. Kopenhagen.

Pethybridge, G. H., 1919: Notes on the saprophytic species of fungi associated with diseased potato plants and tubers. Trans. Brit. Mycol. Soc. **6**.

Priestley, J. H. and Woffenden, L. M., 1923: The healing wounds in potato tubers and their propagation by cut sets. Ann. Appl. Biol. **10**, 96—115.

Rands, R. D., 1917: Early blight of potato and related plants. Wisc. Agr. Exp. Sta. Res. Bull. **42**, 1—48. Zit. nach Klaus (29).

Schmidt, E., 1928: Schädigungen der Kartoffel durch Pilze der Gattung *Fusarium* Lk. Arb. Biol. Reichsanst. **15**, 537—592.

Schmidt, T., 1954: Die Alternaria-Dörrfleckenkrankheit der *Lallemantia iberica*. Pflanzenschutzberichte **12**, 1—14.

Schulze, W. und Fischnich, O., 1951: Über Keimförderung und stoffliche Veränderungen in der Kartoffelknolle bei Beginn und im Verlauf der Keimung. Schriftenreihe der F. A. L., Braunschweig-Völkenrode, Heft 3, 7—113.

Teschner, G., 1953: Untersuchungen über *Alternaria solani*, den Hartfäule-Erreger der Kartoffel und Fruchtfäule-Erreger der Tomate. Diss. Bonn 1951 und Phytopath. Z. **21**, 133—162.

Verhoeven, W. B. L., 1953: Ziekten, selektie en keuring van aardappelen. 5. Auflage. Wageningen.

Vries, H. de, 1878: Beiträge zur speziellen Physiologie landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. IV. Keimungsgeschichte der Kartoffelknollen. Lw. Jb. **7**, 217—249.

Whitehead, T., McIntosh, T. P. and Findlay, W. M., 1953: The potato in health and disease. 3. Aufl., Oliver and Boyd, Edinburg, London.

Wright, R. C., 1932: Some physiological studies of potatoes in storage. J. agric. Res. **45**, 543—555.

Zacha, V., 1948: Přispevek k poznáni houby *Alternaria porri* f. *solani* Neerg. zvláště ve vztahu k infekci hliz Bramborových. Acta Univ. Agric. Silvic. Brno, Č. S. R., **44**.

Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich

Über die chelierende Wirkung einiger Welketoxine*)

IV. Die Verschiebungen der Toxizität durch steigende Absättigung mit verschiedenen Schwermetallionen

Von

E. Gäumann und St. Naef-Roth

Mit 4 Abbildungen

Inhalt: Einleitung. — 1. Kapitel. Die Giftigkeit der verabreichten Metallionen. — 2. Kapitel. Die welkeauslösende Wirkung verschieden abgesättigter Komplexon-III-Schwermetall-Komplexe. — 3. Kapitel. Die welkeauslösende Wirkung verschieden abgesättigter Lycomarasmin-Schwermetall-Komplexe. — 4. Kapitel. Besprechung der Ergebnisse. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

Einleitung

Die Stabilität der zyklisch gebauten Metallkomplexe nimmt im allgemeinen (Mellor und Maley, 1947, 1948; Hein, 1950; Martell und Calvin, 1952) bei den zweiwertigen Metallionen in einer bestimmten Reihenfolge zu:

$$Mg < Mn < Fe < Cd < Zn < Co < Ni < Cu.$$

In der vorangehenden dritten Mitteilung sättigten wir die Modellsubstanz Komplexon III und das Welketoxin Lycomarasmin mit steigenden Mengen von Eisen ab, also mit einem Metall, das etwas unterhalb der Mitte dieser Stabilitätsreihe, im Übergangsbereich von den unstabilen zu den stabileren Metallkomplexen, liegt, und untersuchten dann die Toxizität dieser zyklischen Eisenkomplexe für junge Tomatensprosse.

In der vorliegenden vierten Mitteilung sättigen wir nun die beiden Komplexbildner statt mit steigenden Mengen von Eisen mit steigenden Mengen einiger anderer Metalle aus der oben genannten Stabilitätsreihe ab, wobei Magnesium und Mangan weniger stabile, Kobalt, Nickel und Kupfer dagegen stabilere Komplexe bilden als das Eisen und deshalb die beiden Chelatbildner stärker entgiften sollten als dieses.

*) Die vorliegende Arbeit wurde durch den schweizerischen Nationalfonds zur Förderung wissenschaftlicher Forschung unterstützt; wir möchten den zuständigen Behörden auch hier unseren Dank wiederholen. Ferner danken wir Herrn Kollegen E. Hardegger vom Organisch-chemischen Institut unserer Hochschule für seine unermüdliche Hilfe bei der Beschaffung des benötigten Lycomarasmins.

1. KAPITEL

Die Giftigkeit der verabreichten Metallionen

Von den Metallen, die weniger stabile Komplexe bilden als Eisen, ist das Magnesium in den von uns verabreichten Dosen (bis 243 mg je kg Lebendgewicht in Tabelle 3) für junge Tomatensprosse praktisch gesprochen ungiftig (Tabelle 1), während das Mangan bei der von uns verwendeten maximalen Dosis (Tabelle 3) bereits sehr schwache Schädigungen auslöst (Tabelle 1).

Kobalt, Nickel und Kupfer, welche stabilere Komplexe bilden als Eisen, wirken dagegen schon für sich allein auf junge Tomatensprosse verhältnismäßig giftig. Mit Hilfe der Regressionsgeraden aus den Zahlenreihen der Tabelle 1 wurden die Werte für die Dosis minima der Tabelle 2 berechnet. Sie zeigen, daß die Toxizität dieser Metalle für junge Tomatensprosse in der Reihenfolge, in der sie hier genannt werden, zunimmt: beim Kobalt braucht es nach Tabelle 2 70 mg je kg Lebendgewicht, um bei den Blättern junger Tomatensprosse Schädigungen von der Intensität 1,5 auszulösen, beim Kupfer dagegen nur 40 mg je kg Lebendgewicht.

* Menge Metallionen, die notwendig sind, um bei den Blättern der Tomatensprosse Schädigungen von der durchschnittlichen Intensität 1,5 hervorzurufen.

Tabelle 1

Die Giftigkeit einiger Metallchloride für junge Tomatensprosse

Salz	Metallionen mg/kg Lebendgewicht	Welke-Effekt	
		Stengel	Blätter
$MgCl_2$	79	0	0
	157	0	0
	313	0	0,15
	625	0	0,25
	1250	0,2	0,63
	2500	1,9	0,83
$MnCl_2 \cdot 4\,H_2O$	138	0	0
	275	0	0,10
	550	0	0,25
	1100	0	1,33
	2200	0,5	2,80
$CoCl_2 \cdot 6\,H_2O$	9	0	0
	18	0	0,15
	37	0	0,35
	74	0	1,30
	148	0,4	2,60
	295	1,5	3,65
	590	4,0	4,00
$NiCl_2 \cdot 6\,H_2O$	9	0	0
	18	0	0,08
	37	0	0,90
	73	0	2,15
	146	2,7	2,55
	292	3,9	3,40
	584	4,0	4,00
$CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$	10	0,1	0,35
	20	0,7	0,80
	40	2,1	1,62
	60	2,6	2,15
	80	3,3	2,54
	100	3,8	3,17
	200	3,9	2,92

Tabelle 2

Die Toxizität reiner Schwermetallchloride für junge Tomatensprosse

Verwendetes Schwermetallsalz	Dosis minima* mg/kg Lebendgewicht	keine sichtbare Wirkung mehr bei mg/kg Lebendgewicht
$MgCl_2$	> 2000	250
$MnCl_2 \cdot 4\,H_2O$	1150	200
$CoCl_2 \cdot 6\,H_2O$	70	17
$NiCl_2 \cdot 6\,H_2O$	60	15
$CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$	40	9

Diese hohe Giftigkeit der Kupferionen für junge Tomatensprosse beeinträchtigt unsere Versuche erheblich. Wenn wir z. B. dem Komplexon III die doppelt äquimolare Menge Kupfer anlagern wollten, wie wir dies beim Nickel und beim Kobalt tun, so wären hierfür, bezogen auf die Normaldosis von 1860 mg Komplexon III je kg Lebendgewicht, über 600 mg Cu^{++} je kg Lebendgewicht notwendig. Wenn nur 5 % dieser Kupferionen freibleiben, so sind es rund 30 mg Cu^{++} je kg Lebendgewicht; das sind aber nach Tabelle 2 mehr als zwei Drittel der für die Auslösung kräftiger Nekrosen notwendigen Kupferdosis. Das Kupfer vermag deshalb schon bei einem kleinen Anteil freibleibender Ionen die Versuchsergebnisse zu verfälschen. Um dieser Gefahr zu begegnen, senkten wir bei den Kupferversuchen die Grunddosis Komplexon III und damit auch die anzulagernde Kupfermenge auf die Hälfte.

In qualitativer Hinsicht sind die Schädigungsbilder, welche die drei Metalle für sich allein bei den jungen Tomatensprossen auslösen, recht verschieden.

Beim Magnesium treten auch bei Dosen von 2500 mg/kg nur vereinzelte dunkelgrüne Blattflecken auf; ferner beginnt der Stengel bei diesen unbiologischen Salzgaben Schädigungen, z. B. Knickstellen oder Rillenbildungen, zu zeigen.

Beim Mangan erscheinen bei sehr hohen Dosen rot verfärbte Nekrosen an den Blättern und leichte Schrumpfungen an den Stengeln.

Kobaltvergiftung führt in niederen Dosen zu Nekrosen an den Geweben, die an die Blattrippen und Blattadern angrenzen. Mit steigenden Dosen verstärken sich diese Nekrosen, bis auch die Blatt- und Sproß-Stiele, und zwar unter Rillenbildung, kollabieren; dagegen treten keine eigentlichen Erschlaffungssymptome an den Blatträndern usw. auf.

Bei Nickelvergiftung werden die Blatträndер schlaff und rollen sich ein; Blattnekrosen sind jedoch bei niederen Dosen nur wenig oder gar nicht vorhanden. Bei höheren Dosen verstärkt sich die Erschlaffung der Blatträndер, und es werden nun auch in den Interkostalfeldern unregelmäßige Nekrosen sichtbar. Ferner beginnen die Blattstiele schlaff zu werden und, wie die Sproßachse, leichte Rillenbildungen zu zeigen. Im Endstadium sind die gesamten Blattspreiten nekrotisiert und die Blattstiele fadendünn.

Bei Kupfervergiftung treten in den Interkostalfeldern der Blätter große, unregelmäßige Nekrosen auf, die sich zusehends verstärken und schließlich zusammenfließen. Die Äderchen der Fiederblätter verfärben sich schwarz; an den Blattstielen bilden sich tiefe Rillen, und sie werden im Endstadium fadendünn. Der Stengel ist brüchig.

2. KAPITEL

Die welkeauslösende Wirkung verschieden abgesättigter Komplexon-III-Schwermetall-Komplexe

Die verschiedenen Absättigungsstufen des Komplexons III wurden, wie in unserer dritten Mitteilung, auf zweierlei Weise hergestellt:

§ 1. Die verabreichte Komplexonmenge wurde konstant gehalten und es wurden dieser Grunddosis steigende Mengen der fünf Schwermetallchloride beigefügt; und

§ 2. Die verabreichte Menge von Metallionen wurde konstant gehalten und es wurden den Lösungen der betreffenden Chloride steigende Mengen von Komplexon III beigefügt.

§ 1. Die welkeauslösende Wirkung einer bestimmten Komplexonmenge nach Chelierung mit steigenden Mengen von Schwermetallionen

Die Grunddosis Komplexon III wurde bei den Magnesium-, Mangan-, Kobalt- und Nickelversuchen, wie seinerzeit bei den Versuchen mit Eisenionen, auf 1860 mg je kg Lebendgewicht bemessen, bei den Kupferzusätzen dagegen aus den eingangs genannten Gründen auf 930 mg je kg Lebendgewicht. Die Konzentration der Komplexonlösungen betrug stets $2 \cdot 10^{-2}$ molar.

Zu den Komplexonlösungen wurden steigende Mengen der Metallchloride gefügt. Die Intervalle wurden derart gewählt (Tabelle 3), daß die Komplexonlösungen mit 63, 125, 250, 500, 1000 und 2000 Milliäquivalenten der betreffenden Metalle abgesättigt waren. Die Berechnung dieser Milliäquivalente ist in unserer dritten Mitteilung auf S. 576 nachzusehen. Sämtliche Lösungen wurden auf pH 5,5 eingestellt.

Die Bindung dieser Metalle ist naturgemäß im subäquimolaren und im supraäquimolaren Bereich verschieden. Im subäquimolaren Bereich sind die beiden Partner, nämlich das Komplexon III einerseits und das Metall-Kation anderseits, koordinativ durch freie Eltektronenpaare zu echten, stabilen Metallchelaten verbunden. Im supraäquimolaren Bereich wird dagegen durch die weiter steigenden Zusätze von Metallchloriden das Metallsalz des betreffenden Metallchelates gebildet, also z. B. das Kupfersalz des Komplexon-III-Kupfer-Komplexes; in diesem supraäquimolaren Bereich ist somit die Bindung der beiden Partner, nämlich des zyklischen Komplexon-III-Metall-Komplexes einerseits und der freien Metallionen anderseits, nur noch ionogen, also verhältnismäßig locker.

Die Ergebnisse aus je zwei bis drei Versuchsreihen, die je Stufe 15 Tomatensprosse enthielten, wurden gemittelt. Wir besprechen in der vorliegenden Arbeit nur die Schädigungen der Blätter; denn Stengelschädigungen treten nur bei den giftigen Ionen Co, Ni und Cu auf, und auch hier erst in der höchsten Stufe (2000 Milliäquivalente; Wirkung der freien, durch den Komplexbildner nicht mehr abgesättigten Metallionen in Mengen, die weit über der dosis minima der reinen Salze liegen).

Ferner geben wir aus Gründen der Raumökonomie und um die Versuche, die sich oft über mehrere Wochen hin erstreckten, auf einen gemeinsamen Nenner zu bringen, in Tabelle 4 u. f. nicht die Originalzahlen der

abgelesenen Schädigungen wieder, sondern die relativen Schädigungsindices, bezogen auf die Kontrolle (nur mit Komplexon III behandelt = 100 %).

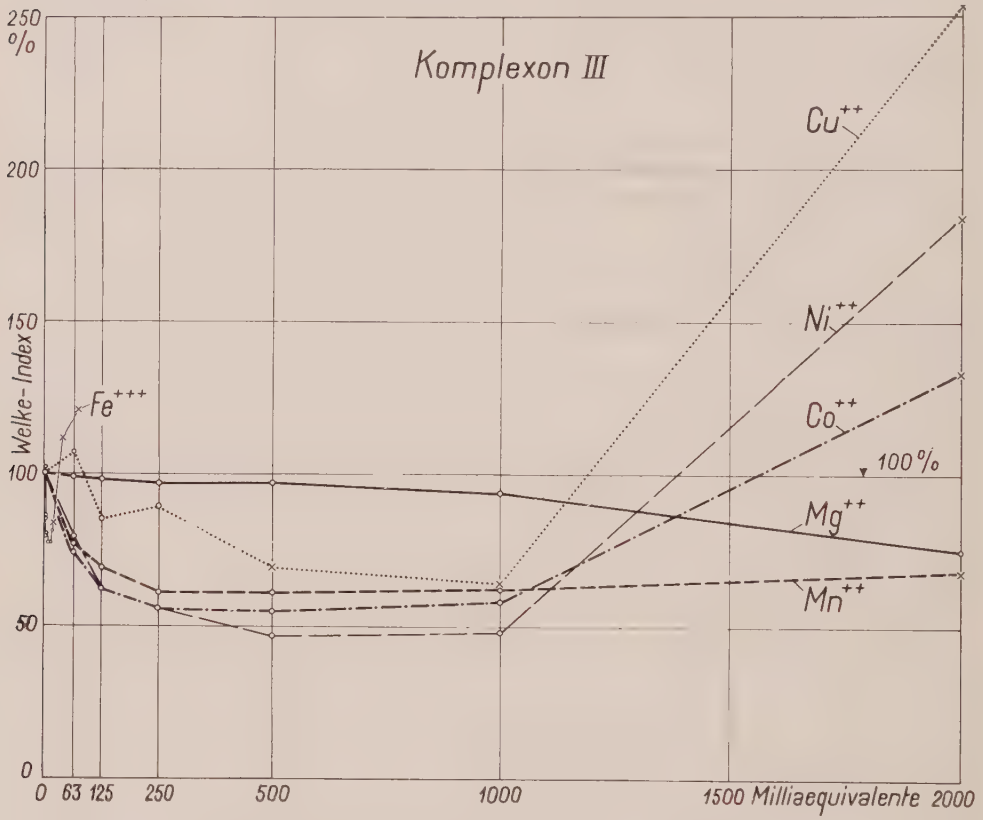

Abb. 1. Die welkeauslösende Wirkung verschieden abgesättigter Schwermetallkomplexe des Komplexons III. Abszisse: Absättigungsstufen (Milli-Molekularäquivalente, in welchen die verschiedenen Schwermetalle angelagert wurden). Ordinate: Relative Schädigungen, bezogen auf die Kontrolle, d. i. auf die Wirkung des Komplexons III für sich allein (Tabelle 4). Die Metallschädigungen sind durch ein Kreuz angedeutet

Tabelle 3

Menge der Schwermetallionen in mg/kg Lebendgewicht, die den Komplexonlösungen zur Erreichung der betreffenden Milliäquivalentwerte zugesetzt wurde

Zugesetztes Schwermetallsalz	Milliäquivalentwerte					
	63	125	250	500	1000	2000
$MgCl_2$	7,6	15,2	30,4	60,8	121,6	243,2
$MnCl_2 \cdot 4\,H_2O$	17,2	34,4	68,7	137,4	274,8	549,6
$CoCl_2 \cdot 6\,H_2O$	18,5	36,9	73,7	147,4	294,8	589,6
$NiCl_2 \cdot 6\,H_2O$	18,4	36,7	73,4	146,8	293,6	587,2
$CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$	9,5	18,9	39,8	79,5	159	318

Tabelle 4

Die Wirkung steigender Zusätze von Schwermetallionen auf den Welke-Effekt von Komplexon III

(Welke-Indices der Blätter in % der Kontrolle)

Schwermetall-ionen	Absättigung der Komplexonlösungen in Milliäquivalenten					
	63 %	125 %	250 %	500 %	1000 %	2000 %
Mg	99 ± 22	98 ± 19	97 ± 17	97 ± 22	94 ± 17	(75 ± 17)
Mn	77 ± 15	69 ± 10	61 ± 15	61 ± 12	62 ± 11	68 ± 13**
Co	74 ± 21	62 ± 22	56 ± 17	55 ± 17	58 ± 13	133 ± 15**
Ni	79 ± 17	69 ± 16	56 ± 21	47 ± 17	48 ± 19	184 ± 25**
Cu	107 ± 27	85 ± 21	89 ± 22	69 ± 24*	64 ± 29**	253 ± 27**

* Komplexonsymptome überlagert von leichten Cu^{++}-Symptomen.
** Reine Salzsymptome.

Die welkeauslösende Wirkung des Komplexons III wird durch die steigende Absättigung mit einem der fünf Metalle unterschiedlich beeinflußt.

Steigende Absättigung mit Magnesium, also mit dem Schwermetall, dessen Komplexe die geringste Stabilität besitzen, bewirkt in keiner Chelierungsstufe eine Veränderung der Toxizität des Komplexbildners. Die gefundenen Werte schwanken zwischen 99 und 94 %, ausgenommen in der letzten Stufe, deren Wert aus unerklärlichen Gründen auf 75 % sinkt. Wir stellen uns vor, daß sich die Komplexon-III-Magnesium-Komplexe im Innern der Zellen gleich wieder lösen; dadurch wird einerseits das Komplexon III als Chelatbildner wieder regeneriert, und anderseits werden die abgelösten Magnesiumionen, weil ungiftig, von den Protoplasten als Ballast symptomlos hingenommen.

Bei steigender Absättigung mit Mangan, also mit dem nächst stabileren Metall, wird dagegen das Komplexon III bis auf 61 % hinunter entgiftet. Der geringe Anstieg von 62 auf 68 %, der in der letzten Spalte der Tabelle 4 beim Übergang von der koordinativen zur ionogenen Bindung erfolgt, ist statistisch nicht gesichert.

Die Manganionen werden offenbar vom Komplexon III genügend stark festgehalten, daß sie einen Teil seiner Bindungskräfte dauernd blockieren und es dadurch teilweise entgiften; und anderseits ist das Mangan für Tomatenpflanzen nur wenig giftig, so daß die durch Zerfall der betreffenden Komplexe und durch Abtausch im Zellinnern freigesetzten Manganionen vom Wirte, wie beim Magnesium, symptomlos hingenommen werden. Erst die unbiologisch große Menge überschüssiger Manganionen, die bei der höchsten Mangangabe (549,6 mg je kg Lebendgewicht) freigesetzt wird, löst gewisse Metallvergiftungen aus.

An dieser Stelle würde nun in der Stabilitätsreihe das Eisen folgen, über dessen Chelate wir in unserer dritten Mitteilung berichtet haben. Auch

das Eisen vermag das Komplexon III anfänglich zu entgiften; so sinkt der Welke-Index des Komplexons III in Tabelle 2 unserer dritten Mitteilung bei einer Absättigung mit 7,5 bis 11 Milliäquivalenten Eisen bis auf 77 % hinab. Mit dieser Depression auf 77 % ist aber der Gleichgewichtszustand zwischen der noch möglichen Absättigung und Entgiftung des Komplexons III einerseits und der einsetzenden Vergiftung der Tomatenpflanzen durch freiwerdende Eisenionen anderseits schon erreicht. Weitergehende Anlagerungen von Eisenionen an das Komplexon III führen deshalb nicht mehr zu einer noch stärkeren Entgiftung des Komplexons III, sondern unmittelbar zum Auftreten von Eisenvergiftungen in den Tomatensprossen und dadurch zu einem steilen Anstieg der Schädigungen; so erreichen sie bei der Absättigung des Komplexons III mit 74 Milliäquivalenten Eisen schon den Wert von 121 %.

Diese gesamte Reaktionsspanne zwischen wachsender Entgiftung des Komplexons III einerseits und beginnender Vergiftung durch freigesetzte Eisenionen anderseits wird bei den Komplexon-III-Eisen-Komplexen in einem derart engen Absättigungsbereich durchlaufen, daß die entsprechende Kurve im Rahmen der Abb. 1 nur ungenügend dargestellt werden kann. Über eine mögliche Deutung dieses besonderen Verhaltens des Eisens werden wir später im 4. Kapitel sprechen.

Bei steigender Absättigung des Komplexons III mit Kobalt bzw. mit Nickel (den beiden nächstfolgenden, von uns geprüften Gliedern der Stabilitätsreihe) durchlaufen die Schädigungsindices wiederum, wie bei steigender Absättigung mit Eisen, eine ausgeprägte Minimumkurve.

Im suboptimalen Kurvenbereich (Abb. 1) nimmt die welkeauslösende Wirkung des Komplexons III bei steigender Absättigung mit einem der beiden Metalle stetig ab; das Komplexon III wird also anfänglich durch beide Metalle entgiftet. Qualitativ entsprechen die Schädigungssymptome durchweg denjenigen des Komplexons III. Im suboptimalen Absättigungsbereich prägt sich somit bei den Kobalt- und Nickel-Komplexen des Komplexons III, wie bei seinen Komplexen mit Eisen, nur der eine Partner, nämlich der Chelatbildner, unmittelbar im Krankheitsbild aus; die dem Komplexon III angelagerten Metallionen bleiben dabei vorläufig stumm, und es ist deshalb gleichgültig, welches Metall die komplexbildenden Kräfte des Komplexons III absättigt.

Im Bereich des Schädigungsminimums erfährt das Komplexon III eine Entgiftung auf 55 % beim Kobalt und auf 47 % beim Nickel. Dieser Tiefpunkt der Schädigungskurve wird bei halbäquimolarer bzw. bei äquimolarer Absättigung des Komplexons III erreicht, also nach Tabelle 3 bei Metallzusätzen von rund 294 mg je kg Lebendgewicht. Wären diese Metallmengen den Tomatensprossen in reiner Form (als Chloride in wässeriger Lösung) zugeführt worden, so hätten sie letale Blattschädigungen im Ausmaß von rund 3,4 bis 3,6 ausgelöst. Anderseits bewirken die als Grunddosis verabreichten 1860 mg Komplexon III je kg Lebendgewicht Blattschädigungen im Ausmaß von rund 2,4 bis 2,6. Werden aber die rund

294 mg Co^{++} bzw. Ni^{++} zuerst an die 1860 mg Komplexon III angelagert und dann den Pflanzen verabreicht, so beträgt der Welke-Index des Gemisches nur noch 0,7 bis 0,8, d. h. er ist weit kleiner als bei jedem der beiden Partner für sich allein. Die beiden Partner haben sich demnach, wie dies bei echter Komplexbildung der Fall sein muß, gegenseitig entgiftet.

Nach dem Durchschreiten des Minimums ändert die Schädigungskurve im supraoptimalen Absättigungsbereich ihren Richtungssinn: die Schädigungen nehmen nunmehr quantitativ zu und erhalten qualitativ ein anderes Gepräge; denn es sind jetzt die Metallionen, die wegen ihrer bloß ionogenen Bindung in einem ähnlichen Ausmaß, wie wir sie jeweils dem Komplexon III anlagern, im Zellinnern auch wieder in Freiheit gesetzt werden und bei den jungen Tomatensprossen wegen ihrer relativ hohen Giftigkeit in zunehmendem Maße Metallschädigungen auslösen.

An dieser Stelle würde nun in der Stabilitätsreihe das Kupfer folgen. Seine Komplexe sollten noch stabiler sein als diejenigen des Kobalts und des Nickels, und das Schädigungsminimum sollte deshalb noch tiefer liegen als dort. Dies war leider in unseren Komplexonversuchen nicht der Fall. Wegen der hohen Giftigkeit des Kupfers für junge Tomatensprosse verfälschen schon die geringen Mengen freier Kupferionen, die bei der Komplexbildung freibleiben, die Ergebnisse in einem Ausmaß, daß die meisten Werte für die Komplexon-III-Kupfer-Komplexe in Tabelle 4 viel zu hoch liegen; so dürfen wir aus Analogie zu den parallelen Versuchen mit Lycomarasmin in Tabelle 7 vermuten, daß der „richtige" Wert des Schädigungsindexes für den äquimolaren Komplexon-III-Kupfer-Komplex bei ungefähr 26 % liegen sollte; in Wirklichkeit stellt er sich bei unserer Versuchsanordnung (wegen der hohen Grunddosis Komplexon III, die mit Kupfer abgesättigt werden muß) auf nicht weniger als 64 %.

Die Schädigungsindices der Komplexon-III-Kupfer-Komplexe durchlaufen zwar in Abb. 1 bei steigender Absättigung des Chelatbildners auch wieder eine Minimumkurve mit einem Tiefpunkt bei äquimolarer Absättigung; da aber an den Tomatenblättern schon bei halbäquimolarer Absättigung leichte Symptome von Kupfervergiftung auftreten, die in den beiden folgenden Stufen noch stark zunehmen, so kann aus Tabelle 4 und Abb. 1 für die Komplexon-III-Kupfer-Komplexe nur geschlossen werden, daß sie sich in ihrer Giftigkeit für junge Tomatensprosse bei steigender Absättigung grundsätzlich gleich verhalten wie die entsprechenden Kobalt- und Nickelkomplexe; dagegen kann aus ihnen für das genaue Ausmaß der Entgiftung des Komplexons nichts geschlossen werden.

Zusammenfassend dürfen wir somit der Tabelle 4 und der Abb. 1 entnehmen, daß sich die Komplexon-III-Schwermetall-Komplexe hinsichtlich der Festigkeit ihrer koordinativen Bindungen der eingangs genannten Stabilitätsreihe einordnen und daß keine Anhaltspunkte für eine selektive Chelierung bestimmter Metalle bestehen. Der eigenartige Verlauf der Toxizitäts-

kurven bei steigender Absättigung des Komplexons III mit einem der sechs Metalle wird vielmehr bedingt durch das Zusammenspiel zwischen der zunehmenden Festigkeit der koordinativen Bindungen der sechs Metalle einerseits und ihrer ungleich rascher wachsenden Giftigkeit für junge Tomatensprosse anderseits. Das Eisen liegt in jenem kritischen Bereich, wo die koordinative Bindungskraft noch verhältnismäßig klein, die Giftigkeit für junge Tomatensprosse dagegen schon sehr groß ist.

§ 2. Die welkeauslösende Wirkung einer bestimmten Metallmenge nach Chelierung mit steigenden Mengen Komplexon III

In § 1 wurde festgestellt, daß das Komplexon III und die ihm angelagerten Metallionen sich bei zunehmender Absättigung gegenseitig um so stärker entgiften, je stabiler ihre Komplexe sind. Die zunehmende Absättigung der Komplexon-III-Metall-Komplexe bewerkstelligten wir in der Weise, daß wir zu einer bestimmten Menge Komplexonlösung steigende Mengen von Metallchloriden fügten. Wir kehren nunmehr das Mischungsverfahren um und fügen zu bestimmten Mengen von Lösungen mit einem konstanten Salzgehalt stufenweise wachsende Mengen von Komplexon III.

Als Grunddosis wurden die Metallchloridlösungen bemessen auf 30,4 mg Mg^{++}, 68,7 mg Mn^{++}, 73,7 mg Co^{++}, 73,4 mg Ni^{++} bzw. 79,5 mg Cu^{++} je kg Lebendgewicht. Zu ihnen wurden 3720, 1860, 930, 465, 233 bzw. 117 mg Komplexon III je kg Lebendgewicht gefügt, so daß die Absättigungen der Komplexe 125, 250, 500, 1000, 2000 bzw. 4000 Milliäquivalente betrugen.

Tabelle 5

Die welkeauslösende Wirkung einer bestimmten Metallmenge nach Chelierung mit steigenden Mengen Komplexon III

(Welke-Indices der Blätter in % der Komplexon-III-Kontrolle)

Schwermetallsalze	Absättigung der Komplexon-III-Metall-Komplexe in Milliäquivalenten						
	125 %	250 %	500 %	1000 %	2000 %	4000 %	Salzkontrolle
Mg	93 ± 12	45 ± 13	17 ± 8	4 ± 4	2 ± 3	1 ± 3	<1
Mn	95 ± 18	25 ± 5	8 ± 5	6 ± 5	5 ± 4*	1 ± 2*	1 ± 2*
Co	83 ± 12	18 ± 7	10 ± 5	6 ± 5	8 ± 7*	13 ± 9*	18 ± 11*
Ni	77 ± 9	16 ± 7	4 ± 3	4 ± 5	10 ± 5*	24 ± 8*	23 ± 9*
Cu	97 ± 4	61 ± 14	34 ± 8	36 ± 4	57 ± 12*	74 ± 11*	76 ± 8*
Komplexon-III-Kontrolle	100	53 ± 8	17 ± 6	9 ± 5	5 ± 3	3 ± 3	—

* Salzsymptome.

In der letzten Spalte der Tabelle 5 sind als „Salzkontrolle" die relativen Schädigungen eingetragen, welche die als Grunddosis verabreichten Salzmengen für sich allein bei den Tomatensprossen auslösen, ferner in

der untersten Zeile der Tabelle 5 die Schädigungen, welche die den Salzlösungen beigefügten Mengen Komplexon III für sich allein verursachen.

Die ungiftigen Ionen Magnesium und Mangan, die für sich allein in der verabreichten Dosis keine Blattschädigungen auslösen (letzte Spalte der Tabelle 5), vermögen in Abb. 2 die Toxizität des Komplexons III für junge Tomatensprosse nicht wesentlich zu verschieben. Beim Magnesium deckt sich vielmehr die Kurve der Welke-Indices vollkommen mit derjenigen des reinen Komplexons; das Magnesium setzt somit die Wirksamkeit des Komplexons III als Chelatbildner im Innern der Pflanze nicht herab. Das Mangan scheint dagegen in den Chelierungsstufen von 250 und 500 Milliäquivalenten die Welkewirkung des Komplexons III leicht zu erniedrigen.

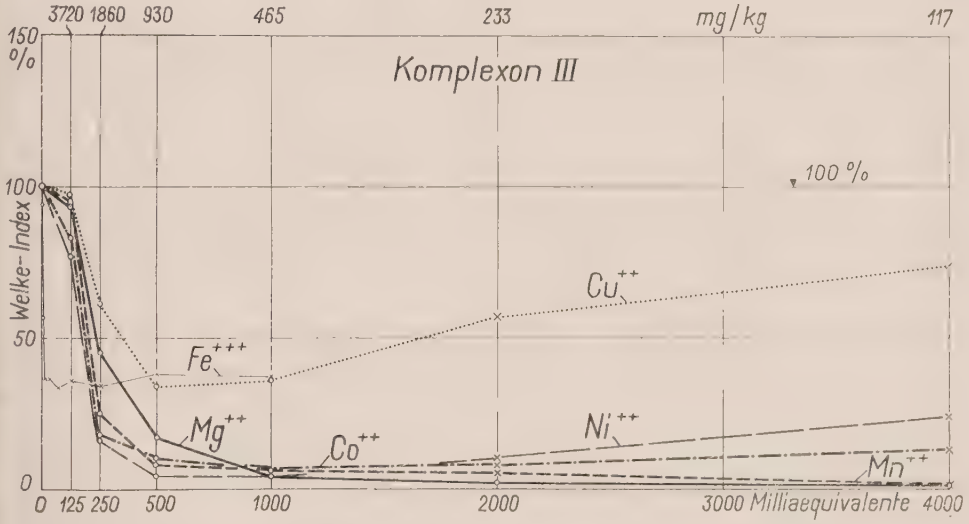

Abb. 2. Die welkeauslösende Wirkung einer bestimmten Metallmenge nach Chelierung mit steigenden Mengen Komplexon III (Tabelle 5). Abszisse: Dosis Komplexon III in mg je kg Lebendgewicht bzw. Milliäquivalente Metallionen, bezogen auf die verabreichte Dosis Komplexon III. Ordinate: Welke-Indices, bezogen auf die Komplexongabe von 3720 mg je kg Lebendgewicht. Mit Kreisen sind die Meßpunkte markiert, welche reine Komplexonsymptome zeigen, mit Kreuzen die Meßpunkte, bei welchen die Symptome der Metallvergiftung dominieren

An dieser Stelle folgt in der Stabilitätsreihe das Eisen. Es nimmt auch bei der vorliegenden Versuchsanordnung (wie bei der inversen Versuchsanordnung des § 1) wegen seiner verhältnismäßig lockeren Bindung, gepaart mit einer hohen Giftigkeit für Tomatensprosse, eine Sonderstellung ein; denn schon zwischen den Absättigungsstufen von 8 und 16 Milliäquivalenten (entsprechend den Anlagerungsmengen von 1860 und 930 mg Komplexon III) ist in Tabelle 3 unserer dritten Mitteilung der Gleichgewichtszustand zwischen der wachsenden Entgiftung des Komplexons III

durch die angelagerten Eisenionen einerseits und der wachsenden Vergiftung der Tomatensprosse durch die im Innern der Zellen freigesetzten Eisenionen anderseits erreicht. Bei der Absättigungsstufe von 16 Milliäquivalenten treten bereits die Symptome der Eisenvergiftung zutage.

Von da an verläuft die Kurve der Schädigungsindices — die ja praktisch gesprochen nur noch von der konstanten Eisendosis geprägt werden — bis zur äquimolaren Absättigung waagerecht, doch wegen der Giftigkeit des Eisens für Tomatensprosse sehr hoch.

Bei den Ionen mit einem stärkeren Bindungsvermögen als Eisen, nämlich bei Kobalt, Nickel und Kupfer, folgen die Schädigungsindices in Tabelle 5 und in Abb. 2 wieder einer ausgesprochenen Minimumkurve: bis zum äquimolaren Absättigungsbereich nimmt die Giftigkeit ihrer Komplexon-III-Komplexe stetig ab; hernach steigt sie wieder an, wobei aber die Symptome der Metallvergiftung im Krankheitsbild dominieren. Bei den Kobalt- und Nickel-Komplexen tritt die gegenseitige Entgiftung der beiden Partner einwandfrei zutage; denn die gesamte Schadwirkung ihrer Komplexe sinkt im äquimolaren Absättigungsbereich nicht nur unter das Schädigungsniveau des Komplexons III für sich allein, sondern auch unter das Schädigungsniveau des Metalles für sich allein, nämlich beim Kobalt von 18 % (Salzkontrolle) auf 6 %, beim Nickel von 23 % (Salzkontrolle) auf 4 %. Beim Kupfer fällt dagegen die Depression der Schädigungskurve wegen der Störung durch die frei bleibenden Kupferionen zu gering aus.

Die Versuche des § 2 führen somit zum selben Ergebnis wie die invers angeordneten Versuche des § 1: Werden Schwermetallionen mit der Modellsubstanz Komplexon III cheliert, so erfolgt zunächst eine gegenseitige Entgiftung der beiden Partner, wobei das Ausmaß dieser Entgiftung durch die Stabilität der betreffenden Komplexe bestimmt wird. Das optimale Absättigungsverhältnis (entsprechend dem Minimum der Toxizität der Komplexon-III-Metall-Komplexe) wird durch die koordinativen Bindungskräfte der verschiedenen Metalle einerseits und durch ihre Giftigkeit für junge Tomatensprosse anderseits bestimmt. Oberhalb dieses Optimums erfolgen in steigendem Maße Vergiftungen durch im Übermaß freigesetzte Metallionen.

3. KAPITEL

Die welkeauslösende Wirkung verschieden abgesättigter Lycomarasmin-Schwermetall-Komplexe

Zu einer bestimmten Menge Lycomarasmin (nämlich 225 mg je kg Lebendgewicht in der Konzentration von $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ molar) wurden die in Tabelle 6 genannten Mengen von Schwermetallchloriden gefügt, so daß das Lycomarasmin stufenweise sechs Absättigungen von 63 bis 2000 Milliäquivalenten erreichte. Sämtliche Lösungen wurden auf pH 5,5 eingestellt.

Da die Grunddosis beim Lycomarasmin weit kleiner ist als beim Komplexon III (nur 225 statt 1860 mg je kg Lebendgewicht), so fallen auch die anzulagernden Metallmengen viel kleiner aus; dadurch unterbleiben die Störungen durch freibleibende Restionen, die insbesondere bei den Komplexon-III-Kupfer-Komplexen das Bild trübten.

Tabelle 6

Menge der Schwermetallionen in mg/kg Lebendgewicht, die den Lycomarasminlösungen zur Erreichung der betreffenden Milliäquivalentwerte zugesetzt wurde

Zugesetztes Schwermetallsalz	Milliäquivalentwerte					
	63	125	250	500	1000	2000
$MgCl_2$	1,3	2,5	5,0	9,9	19,8	39,6
$MnCl_2 \cdot 4\,H_2O$	2,8	5,6	11,2	22,3	44,6	89,2
$CoCl_2 \cdot 6\,H_2O$	3.0	6,0	12,0	23,9	47,8	95,6
$NiCl_2 \cdot 6\,H_2O$	3,0	6,0	11,9	29,8	47,6	95,2
$CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$	3,3	6,5	12,9	25,8	51,6	103,2

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse in Prozenten der Kontrolle angeführt, wobei als Kontrolle (= 100 %) die durchschnittliche Schädigung diente, welche die als Grunddosis verabreichte Lycomarasminmenge für sich allein in dem betreffenden Versuch auslöste. Die Ergebnisse von zwei bis drei parallelen Versuchsreihen mit je 15 Pflanzen je Stufe wurden jeweils gemittelt.

Tabelle 7

Die Wirkung steigender Zusätze von Schwermetallionen auf den Welke-Effekt des Lycomarasmins

(Welke-Indices der Blätter in % der Kontrolle)

Schwermetallionen	Absättigung der Lycomarasminlösung in Milliäquivalenten					
	63 %	125 %	250 %	500 %	1000 %	2000 %
Mg	100 ± 21	103 ± 18	95 ± 18	89 ± 18	91 ± 11	89 ± 15
Mn	91 ± 23	91 ± 27	94 ± 23	98 ± 31	94 ± 16	97 ± 22
Co	96 ± 18	82 ± 23	57 ± 21	46 ± 14	38 ± 23	110 ± 22*
Ni	93 ± 18	86 ± 21	68 ± 17	41 ± 22	34 ± 17	104 ± 25*
Cu	91 ± 24	86 ± 28	74 ± 23	53 ± 19	18 ± 12	122 ± 44*

* Salzsymptome.

Das Magnesium, dessen Komplexe die geringste Stabilität besitzen, vermag aus eben diesem Grunde das Lycomarasmin ebensowenig zu entgiften wie seinerzeit das Komplexon III. Seine Ionen werden offenbar im Innern der Zellen gleich wieder abgelöst, rufen aber, weil ungiftig, keine Schädigungen hervor.

Das Mangan nimmt eine Zwischenstellung ein. In Verbindung mit einem kräftigen Komplexbildner, wie dem Komplexon III, reichen seine

koordinativen Kräfte noch aus, um den Komplexbildner deutlich (in Tabelle 4 bis auf 61 % hinunter) zu entgiften; anderseits rufen die abgelösten Manganionen, weil wenig giftig, keine Metallschädigungen hervor. In Verbindung mit einem schwächeren Komplexbildner wie dem Lycomarasmin vermag es dagegen keine Entgiftung, also keine Depression der Schadwirkung, mehr auszulösen; die Kurve der Schädigungsindices verläuft deshalb in Abb. 3 bei den Lycomarasmin-Mangan-Komplexen ungefähr gleich hoch wie bei den Lycomarasmin-Magnesium-Komplexen.

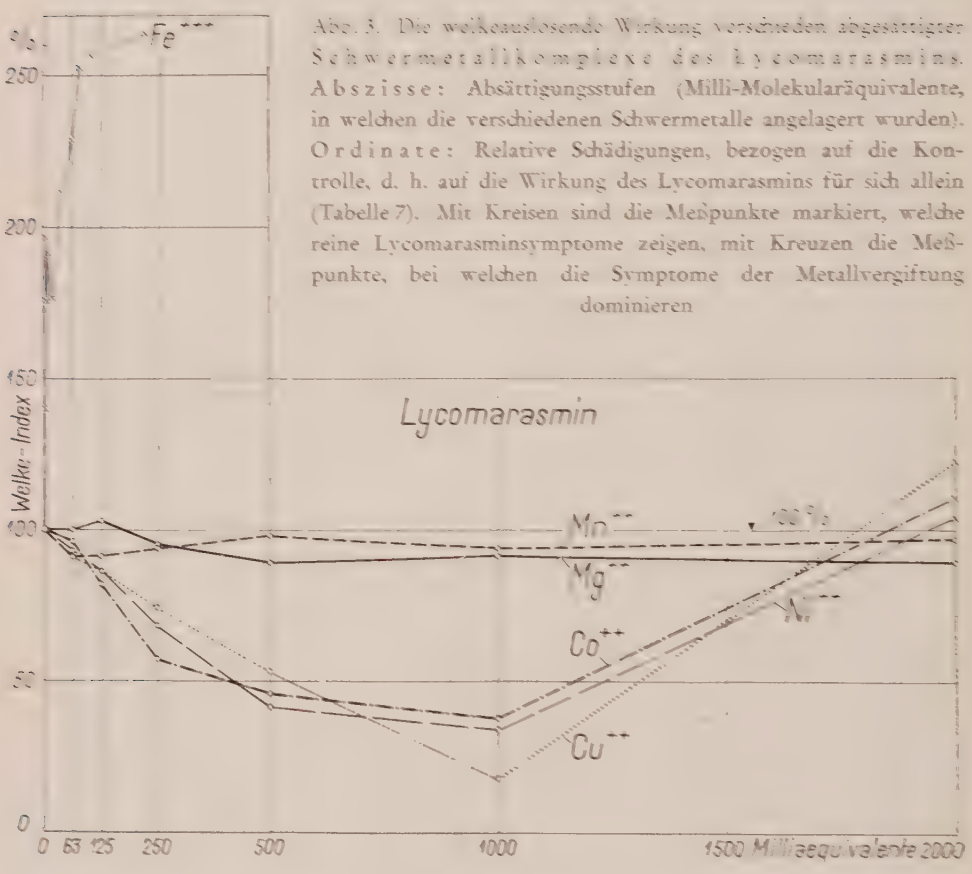

Abb. 3. Die welkeauslösende Wirkung verschieden abgesättigter Schwermetallkomplexe des Lycomarasmins. Abszisse: Absättigungsstufen (Milli-Molekularäquivalente, in welchen die verschiedenen Schwermetalle angelagert wurden). Ordinate: Relative Schädigungen, bezogen auf die Kontrolle, d. h. auf die Wirkung des Lycomarasmins für sich allein (Tabelle 7). Mit Kreisen sind die Meßpunkte markiert, welche reine Lycomarasminsymptome zeigen, mit Kreuzen die Meßpunkte, bei welchen die Symptome der Metallvergiftung dominieren

An dieser Stelle würde in der Stabilitätsreihe wiederum das Eisen folgen. Es nimmt eine ähnliche Zwischenstellung ein wie das Mangan: mit dem Komplexon III als einem kräftigen Komplexbildner vermag es noch genügend stabile Chelate zu bilden, daß das Komplexon III in den niederen Absättigungsstufen entgiftet wird; die Schädigungsindices der Komplexon-III-Eisen-Komplexe durchlaufen deshalb bei steigender Absättigung eine ähnliche Minimumkurve wie die Schädigungsindices der Komplexon-III-Mangan-Komplexe.

Mit dem Lycomarasmin als einem schwächeren Komplexbildner vermag dagegen das Eisen keine hinreichend stabilen Chelate mehr zu bilden; seine Komplexe werden deshalb, wie die Lycomarasminkomplexe des Mangans, im Innern der Zellen gleich wieder gelöst. Nur ist die Giftigkeit der beiden Metalle verschieden: die freigesetzten Manganionen sind in den von uns verwendeten Dosen für junge Tomatensprosse ungiftig, während die entsprechenden Mengen Eisen unmittelbar kräftige Schädigungen hervorrufen.

Beim Kobalt, Nickel und Kupfer sind die koordinativen Bindungskräfte groß genug, daß auch ihre Lycomarasminkomplexe, wie die entsprechenden Komplexon-III-Komplexe, im Innern der pflanzlichen Zellen einigermaßen stabil bleiben. Ihre Welke-Indices durchlaufen deshalb die übliche Minimumkurve.

Im suboptimalen Kurvenbereich wird das Lycomarasmin, wie seinerzeit das Komplexon III, durch sämtliche drei Ionen in zunehmendem Maße entgiftet. Die Metallionen bleiben dabei als solche stumm, und die Symptome werden ausschließlich durch den Chelatbildner, also im vorliegenden Falle durch das Lycomarasmin, geprägt.

Das Minimum der Schadwirkung wird bei sämtlichen drei Metallen bei äquimolarer Absättigung des Lycomarasmins erreicht; also wird eine Molekel Lycomarasmin bei koordinativer Bindung durch ein Ion Co^{++} bzw. Ni^{++} bzw. Cu^{++} maximal entgiftet. Verschieden ist bei den drei Metallen nur die relative Höhe des Tiefpunktes: beim Kobalt liegt er bei 38 %, beim Nickel bei 34 % und beim Kupfer entsprechend der Stabilitätsreihe noch tiefer, nämlich bei 18 %.

Bei einem optimalen Mischungsverhältnis mit Kupfer wird somit das Lycomarasmin fast völlig entgiftet. Die Werte für das Kobalt (38 %) und für das Nickel (34 %) decken sich (wenn man die großen Metallmengen bedenkt, die bei den Komplexonversuchen verwendet wurden) hinlänglich mit den entsprechenden Minimalwerten der Tabelle 4 (47 % für Kobalt, 55 % für Nickel). Beim Kupfer ist dagegen wegen des Salzfehlers in den Komplexonversuchen kein Vergleich möglich.

Die Entgiftung der beiden Chelatpartner erfolgt auch bei den hier in Frage stehenden Lycomarasmin-Metall-Komplexen, wie bei den entsprechenden Komplexon-III-Metall-Komplexen, gegenseitig; so schädigen die als Grunddosis verabreichten 225 mg Lycomarasmin je kg Lebendgewicht die Tomatenblätter ungefähr in der Intensität von 1,8. Die 51,6 mg Cu^{++} je kg Lebendgewicht verursachen ihrerseits nach Tabelle 1, wenn für sich allein verabreicht, eine Schädigung von rund 1,9. Würden sich die beiden Effekte summieren, so müßte die Schadwirkung des betreffenden Lycomarasmin-Kupfer-Komplexes rund 3,7 betragen; statt dessen stellt sie sich nur auf 0,2; sie ist also weit niedriger als bei der verabreichten Lycomarasmindosis für sich allein und als bei der verabreichten Kupferdosis für sich allein.

Nach dem Durchschreiten des Minimums, also im supraoptimalen Ast der Schädigungskurve, nimmt die Toxizität der Kobalt-, der Nickel- und der Kupferkomplexe des Lycomarasmins in Abb. 3 wieder zu. Nur sind es jetzt die Metallionen, die in der Pathogenese und damit im Krankheitsbild dominieren; die Schädigungsbilder entsprechen deshalb jenen des Kobalts, des Nickels bzw. des Kupfers, wie sie im ersten Kapitel geschildert wurden; so sind in Abb. 4 Nekrosen vom Lycomarasmintypus (z. B. GÄUMANN, 1951, Abb. 402) kaum mehr zu erkennen. Die Blattrippen sind vielmehr dunkel verfärbt und kollabiert; die Adern in den rippennahen Blattpartien erscheinen schwarz gefärbt. Die Symptome entsprechen also vollkommen denjenigen einer Vergiftung durch hohe Kobaltdosen.

Abb. 4. Die Symptome der Vergiftung eines Tomatensprosses durch das Kobaltsalz des Lycomarasmin-Kobalt-Komplexes (225 mg Lycomarasmin je kg Lebendgewicht unter Zusatz von 96 mg Co^{++} als Chlorid, entsprechend einer Absättigung des Lycomarasmins mit 2000 Milliäquivalenten Co^{++}). Etwa 3/4 nat. Gr.

Der Ausgangspunkt der Schädigungskurve (entsprechend dem Kontrollwert = 100 %) wird in Abb. 3 im Bereich der ungefähr doppelt äquimolaren Absättigung des Lycomarasmins wieder erreicht (Schädigungsindices zwischen 104 und 122 %). Es braucht somit bei ionogener Bindung ungefähr gleich viel Metallionen, um die Entgiftung des Lycomarasmins wieder rückgängig zu machen, wie es ursprünglich brauchte, um im Bereich der koordinativen Bindungen diese Entgiftung zu bewerkstelligen, nämlich rund 1000 Milliäquivalente; erst dann ist das Ausmaß der neu auftretenden Metallschäden ungefähr gleich groß wie die vorher ausgelöste Desaktivierung des Lycomarasmins.

Bei einer noch weitergehenden Anlagerung von Metallionen an das Lycomarasmin steigen die an den Tomatensprossen auftretenden Salzschäden noch weiter an, so bei Kupfer in einem bestimmten Versuch bei vierfach

äquimolarer Absättigung des Lycomarasmins (208,9 mg Cu^{++} auf 225 mg Lycomarasmin) bis auf 202 %.

Durch die vorliegenden Versuche wird eine Angabe über die Wirkung des Kupfers auf die Toxizität des Lycomarasmins, die wir früher (Gäumann, Naef-Roth und Miescher, 1950) gemacht haben, ergänzt. Wir stellten dort fest, daß ein äquimolarer Zusatz von Eisenchlorid zum Lycomarasmin dessen Giftigkeit stark erhöht, während beim gleichen Zusatz von Kupferchlorid oder Kupfersulfat diese Erhöhung ausbleibt; diese Beobachtung hat dann Waggoner und Dimond (1953) zu weitgehenden theoretischen Betrachtungen veranlaßt.

Heute wissen wir auf Grund unserer verfeinerten Arbeitsmethoden, daß die Anlagerung einer äquimolaren Kupfermenge nicht nur keine Steigerung der Toxizität des Lycomarasmins bewirkt, sondern das Lycomarasmin bis auf 18% hinunter entgiftet. Die entsprechenden Schlußfolgerungen von Waggoner und Dimond fallen deshalb dahin.

4. KAPITEL

Besprechung der Ergebnisse

Die pflanzenpathogenen Toxine vom Typus des Lycomarasmins und der Fusarinsäure schädigen die Organellen und Funktionen der für sie sensiblen Wirtszellen offenbar auf mehrfache Weise. Eine dieser Schädigungsmöglichkeiten beruht auf ihrer Fähigkeit, mit Schwermetallen zyklisch gebaute Komplexe (Chelate) zu bilden und sie dadurch dem Stoffwechsel des Wirtes zu entziehen. Dieser Gesichtspunkt wurde bereits von Tamari und Kaji (1952, 1953) für die Wirkung der Fusarinsäure auf Reispflanzen besprochen.

Im vorliegenden Zyklus von Arbeiten untersuchten wir die Frage, in welcher Weise sich die Giftigkeit des Lycomarasmins für Tomatensprosse verschiebt, wenn ihm vor seiner Einführung in die Tomatensprosse (der Einfachheit halber verwenden wir hierfür künftighin den Ausdruck „präinfektionell") steigende Mengen bestimmter Metallionen angelagert werden. Aus den Veränderungen der Toxizität, die das Lycomarasmin durch diese „präinfektionelle" Anlagerung von Metallionen erfährt, hofften wir einen Einblick in den Mechanismus seiner pathogenen Wirksamkeit im Innern der Wirtszellen zu gewinnen.

Als Vergleichs- und Modellsubstanz für diese Möglichkeit der pathogenen Wirkung des Lycomarasmins verwendeten wir das Komplexon III (das Dinatriumsalz der Aethylendiamintetraessigsäure), das ein ähnliches Molekulargewicht besitzt wie das Lycomarasmin, die Tomatensprosse in einer ähnlichen Weise (jedoch erst bei einer weit höheren Dosis) schädigt und, wie das Lycomarasmin, wasserlösliche Metallkomplexe bildet; nur

besitzt es als ein modellhafter Chelatbildner ein stärkeres Bindungsvermögen als das Lycomarasmin.

Unsere Versuche lassen erkennen, daß die Giftwirkung des Lycomarasmins in diesem Wirkungssektor nicht nur von der Menge der in die sensibeln Wirtsgewebe einwandernden Toxinmolekel abhängt, sondern überdies auch vom Ausmaß ihrer Absättigung mit Metallionen. Eine bestimmte Lycomarasminmenge erzeugt also (und dasselbe wird auch für andere Chelatbildner, z. B. für die Fusarinsäure, gelten) an jungen Tomatensprossen nicht immer genau dieselben Schädigungen; ihre Toxizität ist nicht unbedingt eine konstante Größe; sondern die Intensität und die Qualität der durch sie erzeugten Schädigungen hängen außer von der applizierten Dosis auch von der Art und vom Ausmaß der bereits angelagerten Metallionen ab.

In grober Vereinfachung stellen wir uns vor, daß die Toxizität des Lycomarasmins bei steigender Anlagerung von Metallionen zwei Absättigungsbereiche durchläuft, in welchen unterschiedliche Wirkungsmechanismen dominieren, nämlich einen suboptimalen Absättigungsbereich, in welchem die durch den Chelatbildner ausgelösten Mangelschäden (verursacht durch den Entzug lebenswichtiger Metallionen) im Krankheitsbild überwiegen, und einen supraoptimalen Absättigungsbereich, in welchem das Krankheitsbild vorwiegend durch die vom Chelatbildner ausgelösten Überschwemmungsschäden (verursacht durch die Freisetzung giftiger Metallionen) geprägt wird. Doch handelt es sich hierbei nur um einen summarischen, für uns Menschen visuell erkennbaren Schlußeffekt aus sehr verschiedenartigen und zum Teil gegenläufigen Vorgängen, von denen wir nunmehr einige näher betrachten möchten.

§ 1. Der suboptimale Absättigungsbereich

Die Lycomarasminmolekeln, die mit dem Transpirationsstrom von den Zellwänden her in das Innere der sensibeln Wirtszellen gelangen, lagern sich dort zu Beginn der Pathogenese sämtliche ihnen zugänglichen Metallionen an, und zwar — da es sich um zyklisch gebaute Komplexe handelt — wohl zumeist im Verhältnis 1 Lycomarasminmolekel auf 1 Fe^{+++}- oder 1 Cu^{++}-Ion.

Diese Metallionen entziehen sie den lebenswichtigen Organellen und Funktionssystemen der Wirtszellen; auf diese Weise schädigen sie durch den Entzug von Magnesium die Photosynthese, ferner u. a. die Funktion der Pyruvatdecarboxylase, durch den Entzug von Mangan die Funktion gewisser Peptidasen. Ferner wird z. B. die Wirkung der Cytochromoxydasen und der Katalase durch den Entzug von Eisen, diejenige der Dipeptidasen durch den Entzug von Kobalt und diejenige der Phenol- und Ascorbinatoxydasen durch den Entzug von Kupfer beeinträchtigt usw. Neben diesen lokalisierten bzw. definierten Mangelschäden werden aber in den verschiedenen Wirkungsbezirken der Zelle ganz allgemein auch die Ionengleichge-

wichte gestört, so daß Ionenantagonismen (z. B. Mn : Fe, Cu : Mn) zur Entfaltung gelangen, alles Dinge, die weit über unseren Kenntnisbereich als Nichtspezialisten hinausgehen.

In welcher Weise diese verschiedenen Aspekte der pathogenen Wirksamkeit des Lycomarasmins nebeneinander hergehen, sich gegenseitig beeinflussen und sich kombinieren, wissen wir nicht. Das Verständnis ihrer komplizierten Verzahnung wird überdies durch den Umstand erschwert, daß neben diesen Mangelschäden offenbar gleich von Anfang an auch gegenläufige Schädigungen, nämlich Metallschäden, ausgelöst werden, die sich freilich im Krankheitsbild noch nicht als solche ausprägen. Der Zeitpunkt, wann diese Überschwemmungsschäden aufzutreten beginnen, wird seinerseits beeinflußt durch die Metallionen, die sich das Lycomarasmin schon vor der eigentlichen Pathogenese, nämlich schon auf seinem Wanderungswege vom Orte seiner Bildung zum Orte seiner spezifischen Wirksamkeit anlagert.

Im suboptimalen Absättigungsbereich sind deshalb zwei unterschiedliche Problemstellungen auseinanderzuhalten, nämlich:

a) das Problem der eigentlichen Pathogenese, die gesteuert wird durch das unterschiedliche Chelierungsvermögen der Lycomarasminmolekeln für die verschiedenen Schwermetallionen in den verschiedenen Wirkungsbezirken der Wirtszellen, und

b) das Problem der unterschiedlichen pathogenen Disposition des Lycomarasmins, die ihrerseits beeinflußt wird durch die Art und die Menge der Metallionen, welche sich die Lycomarasminmolekeln auf ihrem Wanderungswege vom Ort ihrer Bildung zum Orte ihrer spezifischen Wirksamkeit anlagern.

a) Das unterschiedliche Chelierungsvermögen des Lycomarasmins für Schwermetallionen in den Wirtszellen

Mit Magnesium und Mangan bildet das Lycomarasmin unstabile Komplexe, die im Zellinnern gleich wieder zerfallen; doch sind die betreffenden Ionen in den hier zu berücksichtigenden Dosen ungiftig. Das Lycomarasmin schädigt deshalb die Wirtszellen im Mg- und Mn-Sektor nur dadurch, daß es den betreffenden Wirkungsbezirken diese Ionen entzieht; dagegen erfolgt beim nachträglichen Zerfall seiner Mg- und Mn-Komplexe keine zusätzliche Schädigung mehr, sondern die in Freiheit gesetzten Mg- und Mn-Ionen bilden für die Wirtszellen nur einen mehr oder weniger harmlosen Ballast.

Auch die mit Eisen sich bildenden Lycomarasminkomplexe sind im Zellinnern unstabil; doch ist das Eisen, im Gegensatz zum Magnesium und zum Mangan, für Tomatensprosse sehr giftig. Der pathogene Effekt des Lycomarasmins ist deshalb im Eisensektor ambivalent: einerseits verursacht es in gewissen Wirkungsbezirken der Wirtzellen Mangelschäden durch Entzug von Eisen, und gleichzeitig in anderen Wirkungsbezirken Überschwemmungsschäden, indem es die aus ihrem organischen Ver-

bande herausgelösten Eisenionen beim Zerfall der betreffenden Komplexe am „unrichtigen" Orte freisetzt.

Die Komplexe, die das Lycomarasmin mit Kobalt, Nickel und Kupfer eingeht, sind dagegen in zunehmendem Maße stabil. Die durch das Lycomarasmin in diesem Sektor ausgelösten Schädigungen bestehen deshalb zur Hauptsache aus Mangelschäden durch Entzug der betreffenden Ionen aus lebenswichtigen Funktionssystemen; der zusätzliche Schädigungseffekt durch eventuell frei werdende Co-, Ni- bzw. Cu-Ionen ist wegen der hohen Stabilität der betreffenden Chelate trotz der großen Giftigkeit dieser Metallionen wahrscheinlich klein.

Wegen dieses gleichzeitigen Bestehens von Mangel- und von Überschwemmungsschäden (wobei die Mangelschäden im suboptimalen Absättigungsbereich der Lycomarasmin-Metall-Chelate bei weitem dominieren) läßt sich die Toxizität des Lycomarasmins durch praeinfektionelle Anlagerung von Metallionen nie auslöschen, d. h. nie bis auf den Nullwert herabsetzen; so wurden in Tabelle 7 der vorliegenden Arbeit sämtliche Lycomarasminmolekeln mit Kupfer abgesättigt, also mit dem Metall, das mit Lycomarasmin die stabilsten Komplexe bildet und in wässeriger Lösung durch die übrigen Glieder der Stabilitätsreihe nicht mehr aus ihnen verdrängt werden kann. Trotz dieser Blockierung sämtlicher Lycomarasminmolekeln wurde aber ihre Toxizität für junge Tomatensprosse doch nicht völlig ausgelöscht, sondern nur auf 18 % herabgesetzt. In diesem Restbetrag von 18 % sind drei verschiedenartige Anteile enthalten:

1. Unmittelbare Kupfer-Überschwemmungsschäden, ausgelöst durch die (sehr giftigen) Kupferionen, welche wegen des Zerfalls einiger Lycomarasmin-Kupfer-Komplexe und wegen der direkten Ablösung der Kupferionen durch kräftigere zelleigene Chelatbildner an „unrichtige" Orte gelangten;

2. Mangelschäden, verursacht durch Lycomarasminmolekel, die durch die Ablösung des Kupferions in ihrer Chelierungsfähigkeit wieder regeneriert wurden, und

3. ein nicht näher bestimmbarer Anteil an Schädigungssymptomen, die durch andere Wirkungsmechanismen des Lycomarasmins als durch Chelatbildung ausgelöst werden, aber den Chelierungsschäden ähnlich sehen (Phaenokopien) und deshalb bei unserer Bonitierung unter den Chelierungssektor fallen.

b) Die Veränderung der Toxizität des Lycomarasmins durch Anlagerung der auf dem Wanderungswege verfügbaren Metallionen

Auf dem Wanderungswege vom Orte ihrer Bildung zum Orte ihrer spezifischen Wirksamkeit lagern sich die Lycomarasminmolekel alle ihnen zugänglichen Metallionen an und nehmen sie an den Ort ihrer spezifischen Wirksamkeit mit (Vehikeleffekt); es ist dies der gleiche Vorgang, den wir bei unseren Versuchen mit der präinfektionellen Anlagerung von Tomatensproßasche bzw. von einzelnen Metallionen nachahmten.

Dieser Entzug von Metallionen löst in den Leitungsbahnen der Stengel, Blattstiele und Blattnerven keine Symptome, also keine manifesten Schädigungen aus; seine Bedeutung beruht vielmehr darauf, daß er die Toxizität des Lycomarasmins verändert: Je nach der Art und der Menge der unterwegs angelagerten Metallionen kommt es pathogen verschieden „disponiert" in den Interkostalfeldern der Blätter an.

Bei den Magnesium- und Manganionen dürfte diese zusätzliche Zufuhr wegen ihrer Ungiftigkeit von geringer Bedeutung sein. Bei den Kobalt-, Nickel- und Kupferionen führt die vorzeitige Anlagerung sogar zu einer Entgiftung des Lycomarasmins; es spielt sich hier offenbar in vivo derselbe Vorgang ab, der in den Co-, Ni- bzw. Cu-Kurven der Abb. 3 bei der praeinfektionellen Anlagerung dieser Metalle zum Ausdruck kommt: Je mehr derartige, stabile Komplexe bildende Ionen an das Lycomarasmin angelagert werden, um so mehr nimmt anfänglich seine Toxizität für junge Tomatensprosse ab.

Der neuralgische Punkt der örtlichen Zufuhr von wirtseigenen Metallionen liegt vielmehr im Eisensektor; denn die Lycomarasminmolekeln, die sich unterwegs ein Eisenion angelagert haben, zerfallen offenbar wieder in den Blattgeweben und lösen in den hierfür empfindlichen Funktionssystemen der Zellen entsprechende Metallschäden aus. Der Schwellenwert, bei dem die Symptome von Eisenvergiftungen im Krankheitsbild sichtbar werden, ist noch unbekannt. In Tabelle 6 unserer dritten Arbeit lagerten wir den 225 mg Lycomarasmin präinfektionell 0,04 mg Fe^{+++} an, und es traten in den Blättern der Tomatensprosse noch keine Symptome von Eisenschädigungen zutage, wohl aber bei der präinfektionellen Anlagerung von 0,06 mg Fe^{+++}.

Es ist unwahrscheinlich, daß diese Eisenmenge von 0,06 mg je kg Lebendgewicht für sich allein in den Tomatensprossen die Symptome einer manifesten Eisenvergiftung auslöst; denn es hat ja bei diesem Mengenverhältnis nur rund eine Lycomarasminmolekel auf tausend ein Eisenion angelagert erhalten. Die Erklärung liegt vielmehr darin, daß die Eisenmenge, die das Lycomarasmin auf seinem Wanderungswege durch den Sproß bis hinaus in die Interkostalfelder der Blätter spontan aufnahm, für sich allein schon nahezu genügte, um in den Blättern Eisenüberschwemmungsschäden zu verursachen, und daß es deshalb nur noch einer kleinen zusätzlichen Dosis (0,06 mg Fe^{+++} je kg Lebendgewicht) bedurfte, um die Schädigungsschwelle manifest zu überschreiten.

Soweit also das Lycomarasmin in seiner Eigenschaft als Chelatbildner die Tomatenpflanzen schädigt, liegt sein kritischer Schädigungsbereich im Eisensektor. Für das Zustandekommen dieser Schlüsselposition des Eisens wirken mehrere Faktorengruppen zusammen, z. B.:

1. Die geringe Stabilität der Lycomarasmin-Eisen-Komplexe. Die koordinativen Bindungskräfte des Lycomaras-

mins sind (gemessen an denjenigen der Modellsubstanz Komplexon III) verhältnismäßig gering; anderseits ist auch die Komplexbildungskonstante des Eisens verhältnismäßig niedrig; denn es liegt unterhalb der Mitte der MELLOR-MALEYschen Stabilitätsreihe. Bei der Bildung der Lycomarasmin-Eisen-Komplexe bringen somit beide Partner ein verhältnismäßig geringes Bindungsvermögen mit, und dies hat zur Folge, daß die Lycomarasmin-Eisen-Komplexe im Innern der sensibeln Wirtszellen leicht wieder zerfallen; dadurch wird einerseits das Eisen am „unrichtigen" Orte freigesetzt, und anderseits wird das Lycomarasmin in seiner Eigenschaft als Chelatbildner wieder regeneriert.

2. Die Photosensibilität der Lycomarasmin-Eisen-Komplexe. Durch JONES und LONG (1952) und HILL-COTTINGHAM (1955) wurde gezeigt, daß die Eisenkomplexe, nicht aber die Nickel- und Kupferkomplexe des Komplexons III photosensitiv sind und daß die Komplexon-III-Ferri-Komplexe im Lichte zum Teil zerfallen, zum Teil zu den entsprechenden Komplexon-III-Ferro-Komplexen reduziert werden. Dieser Vorgang spielt sich zweifelsohne auch in vivo, also auch im Innern der Tomatenpflanzen ab; er erklärt nachträglich, warum bei unseren Versuchen (GÄUMANN, NAEF-ROTH und KERN, 1955, S. 575) die Komplexon-III-Ferri-Komplexe, entgegen der Annahme von DIMOND und WAGGONER (1953), dieselbe Toxizität für junge Tomatensprosse besitzen wie die entsprechenden Komplexon-III-Ferro-Komplexe.

Zu gleicher Zeit spielen sich jedoch in anderen Wirkungsbezirken der Wirtszellen auch die entgegengesetzten Vorgänge ab, nämlich Oxydationen, durch welche die Komplexon-III-Ferro-Komplexe wieder in Komplexon-III-Ferri-Komplexe + OH' zurückgebracht werden. Durch wiederholte Photoreduktion mit nachfolgender Reoxydation werden genügend Hydroxylionen freigesetzt, daß der Hydroxykomplex des Komplexons III, nämlich Fe (OH) Komplexon III, entsteht und schließlich Eisenhydroxyd ausfällt.

Für die Eisenkomplexe des Lycomarasmins sind zwar diese Mechanismen noch nicht im einzelnen ausgemessen worden; doch bestätigt uns Herr Kollege G. SCHWARZENBACH, daß die soeben geschilderte Vorstellung der hin und her schaukelnden Photoreduktion und Reoxydation ceteris paribus auch auf die Lycomarasmin-Eisen-Komplexe übertragen werden darf. Auch die Lycomarasmin-Ferri-Komplexe sind demnach, wie die entsprechenden Komplexon-III-Komplexe, photosensitiv und werden in ihrem Zerfall durch das Licht begünstigt. Dadurch erklärt sich die hochgradige Labilität der Lycomarasmin-Eisen-Komplexe im Innern der Tomatenpflanzen, die wir uns auf Grund unserer physikalisch-chemischen Vorstellungen nie befriedigend zurechtlegen konnten; denn für die Toxizitätsbestimmungen werden die Tomatensprosse während 48 Stunden einem konstanten Dauerlicht ausgesetzt, also gerade jener Versuchsbedingung, die den Zerfall der Lycomarasmin-Eisen-Komplexe beschleunigt.

3. Die besondere Toxizität der Eisenionen für Tomatensprosse. Die Tatsache, daß die Zufuhr von 0,04 mg Fremd-

eisen je kg Lebendgewicht in den jungen Tomatensprossen noch keine manifesten Schädigungen auslöst, wogegen schon eine Zufuhr von 0,06 mg Fremdeisen je kg Lebendgewicht deutliche Eisenschädigungen verursacht, läßt sich kaum auf Grund der physikalisch-chemischen Gleichgewichtsvorgänge erklären, die sich bei der Chelierung bzw. Ablösung des Eisens abspielen. Wir müssen uns vielmehr vorstellen, daß die durch das Lycomarasmin herangeführten und dann im Zellinnern freigesetzten Eisenionen dort gezielte, spezifische Reaktionen auslösen, Reaktionen, die zu gezielten, spezifischen Schädigungen bestimmter lebenswichtiger Enzym- und anderer Wirkungssysteme im Zellinnern führen.

Wegen dieser spezifischen Schädigung bestimmter Schlüsselfunktionen durch kleinste Mengen herangeführten Eisens spielt das Lycomarasmin in diesem Sektor vorwiegend eine Rolle in seiner Eigenschaft als Vehikel, das die Eisenionen, die an sich nicht wanderungsfähig wären, bis in die Grundgewebe der Blätter verfrachtet. In jenen sensibeln Geweben spielen sich aber die entscheidenden Vorgänge nicht an den Lycomarasminmolekeln ab, sondern bei den Eisenionen, Vorgänge, die sich unserer Kenntnis entziehen.

§ 2. Der supraoptimale Absättigungsbereich

Falls die Anlagerung von Metallionen an das Lycomarasmin auch nach dem Durchschreiten des Sättigungsoptimums weitergeht, so verschiebt sich in den Spreiten der Tomatenblätter der Schwerpunkt der Pathogenese immer mehr von den Mangel- zu den Überschwemmungsschäden hin. Die beiden für den suboptimalen Absättigungsbereich des Lycomarasmins besprochenen gegenläufigen Schädigungsmöglichkeiten, der Mangeleffekt und der Überschwemmungseffekt, gehen also auch weiterhin nebeneinander her; nur prägen sich jetzt die Überschwemmungsschäden visuell im Krankheitsbild aus.

Die hierbei wirksamen Mechanismen sind wohl sehr komplex. Ein Teil der zusätzlich angelagerten Metallionen ist wahrscheinlich bloß ionogen statt koordinativ gebunden und löst sich deshalb wieder leicht ab; ein anderer Teil wird durch die Ionenkonkurrenz in Freiheit gesetzt: die Metallionen mit einer größeren Komplexbildungskonstanten verdrängen die labileren Metallionen aus ihrer Bindung mit den Lycomarasminmolekeln und setzen sich an ihre Stelle; Kupferionen werden also ceteris paribus Eisenionen abtauschen und in Freiheit setzen, Eisenionen die Manganionen usw.

Auf diese Weise entstehen, da ja die Wirksamkeit ein und desselben Ions im Innern ein und derselben Zelle milieuspezifisch verschieden ist, vollkommen undurchsichtige Schädigungsfelder; so mag das Eisen im Überschuß-Sektor gewisse Plasmagrenzschichten blockieren oder mit Säuren des Krebszyklus Komplexe bilden oder gewisse Proteine ausfällen, während es gleichzeitig im Mangelsektor anderen lebenswichtigen Funktionssystemen derselben Zelle fehlt.

Der pathogene Effekt des Lycomarasmins (und der übrigen chelatbildenden Welketoxine) setzt sich deshalb allein schon im Metallsektor aus einer ganzen Reihe von Einzelprozessen und Einzelschädigungen zusammen, die nicht unmittelbar — oder jedenfalls nicht starr — miteinander verknüpft sind und in manchen Fällen sogar gegensinnig verlaufen.

Die Wirkungsweise des Lycomarasmins ändert sich deshalb im Laufe der Erkrankung mit dem Ausmaß seiner Absättigung mit Metallionen. Da aber kleine Lycomarasminmengen rascher abgesättigt sind als große, wirken sie auch qualitativ in einem gewissen Rahmen anders als große; deshalb kann sich die Wirkungsweise des Lycomarasmins bei Infekten in vivo auch mit der Heftigkeit der Erkrankung in einem gewissen Rahmen ändern, bei akuten Infekten sich etwas anders gestalten als bei chronischen, bei kurzen Wanderungswegen etwas anders als bei langen, alles Dinge, die in ihrer Kompliziertheit weit über das Wissen der beiden Verfasser hinausragen.

Zusammenfassung

1. An die Modellsubstanz Komplexon III bzw. an das Lycomarasmin als einem echten Welketoxin wurden vor ihrer Einführung in die Tomatensprosse steigende Mengen von Mg-, Mn-, Fe-, Co-, Ni- bzw. Cu-Ionen angelagert. Aus den Verschiebungen der Toxizität, welche diese beiden Stoffe durch diese „präinfektionelle" Anlagerung von Metallionen erfuhren, wurde ein Einblick in den Mechanismus ihrer pathogenen Wirksamkeit im Innern der Wirtszellen gewonnen.

2. Die Schwermetallkomplexe beider Stoffe ordnen sich hinsichtlich der Festigkeit ihrer koordinativen Bindungen der MELLOR-MALEYschen Stabilitätsreihe ein, und es bestehen keine Anhaltspunkte für eine selektive Chelierung bestimmter Metalle.

3. Die pathogene Wirkung der betreffenden Metallkomplexe für junge Tomatensprosse wird einerseits bestimmt durch die Festigkeit ihrer koordinativen Bindungen und anderseits durch die Giftigkeit der betreffenden Metallionen.

Durch steigende Anlagerung von Magnesium als dem schwächsten Komplexbildner wird die Giftigkeit des Komplexons III und des Lycomarasmins für junge Tomatensprosse nicht verändert (Abb. 1 und 3, Kurve Mg^{++}). Die Magnesiumionen werden offenbar im Zellinnern gleich wieder abgelöst, rufen aber, weil ungiftig, keine Schädigungen hervor.

Beim Mangan reichen die koordinativen Bindungskräfte schon aus, um einen kräftigen Komplexbildner wie das Komplexon III bis auf rund 61 % hinunter zu entgiften (Abb. 1, Kurve Mn^{++}). Seine Chelate mit einem schwächeren Komplexbildner wie dem Lycomarasmin zerfallen dagegen im Zellinnern; deshalb vermag das Mangan das Lycomarasmin nicht zu entgiften (Abb. 3, Kurve Mn^{++}); anderseits rufen die abgelösten Manganionen in den von uns verwendeten Dosen keine Schädigungen hervor.

Beim Kobalt, Nickel und Kupfer sind die koordinativen Bindungskräfte groß genug, daß sowohl ihre Komplexon-III- als ihre Lycomarasmin-Komplexe im Innern der Wirtszellen einigermaßen stabil bleiben. Beide Komplexbildner werden deshalb im suboptimalen Absättigungsbereich durch sämtliche drei Ionen in zunehmendem Maße entgiftet; die Metalle bleiben dabei als solche stumm, und die Symptome werden ausschließlich durch den Chelatbildner geprägt. Das Maximum der Entgiftung wird bei sämtlichen drei Metallen bei der äquimolaren Absättigung der Komplexbildner erreicht (Abb. 1 und 3); für die Lycomarasmin-Kobalt-Komplexe liegt das Minimum der Schädigungskurve bei 38 %, für die Nickelkomplexe bei 34 % und für die Kupferkomplexe bei 18 %; Kupfer vermag somit das Lycomarasmin bis auf 18 % hinunter zu entgiften. Wird die Anlagerung der drei Metalle über die äquimolare Absättigung hinaus fortgesetzt, so werden die betreffenden Metallionen, weil nur noch ionogen gebunden, im Zellinnern in steigendem Maße abgelöst und rufen entsprechende Metallververgiftungen hervor (z. B. Abb. 4).

4. Soweit das Komplexon III und das Lycomarasmin in ihrer Eigenschaft als Chelatbildner die Tomatenpflanzen schädigen, liegt ihr kritischer Schädigungsbereich im Sektor des Eisens. Das Eisen nimmt nämlich hinsichtlich seiner Komplexbildungsfähigkeit und seiner Giftigkeit eine Zwischenstellung ein: seine Komplexe zerfallen offenbar im Zellinnern ebenso leicht wie diejenigen des Magnesiums und des Mangans, und andererseits ist das Eisen für die Tomatensprosse mindestens ebenso giftig wie das Kobalt, das Nickel und das Kupfer.

Der pathogene Effekt des Lycomarasmins ist im Eisensektor ambivalent: einerseits verursacht es in gewissen Wirkungsbezirken der Wirtszellen Mangelschäden durch Entzug von Eisen, und andererseits verursacht es gleichzeitig in anderen Wirkungsbezirken der Wirtszellen Überschwemmungsschäden, indem es die aus ihrem organischen Verbande herausgelösten Eisenionen beim Zerfall der betreffenden Komplexe am „unrichtigen" Orte freisetzt. Für diese Überschwemmungsschäden wird einerseits (wegen ihres plötzlichen Auftretens) eine eng gezielte, spezifische Schädigungsreaktion angenommen; andererseits wird vermutet, daß die Eisenionen, die sich das Lycomarasmin auf seinem Wanderungswege bis hinaus in die Interkostalfelder der Blätter anlagert, beim Zustandekommen dieser Überschwemmungsschäden eine entscheidende Rolle spielen; werden nämlich dem Lycomarasmin praeinfektionell 0,04 mg Fremdeisen je kg Lebendgewicht angelagert, so treten an den Tomatensprossen keine visuellen Eisenschädigungen auf, wohl aber bei der Anlagerung von 0,06 mg Fremdeisen je kg Lebendgewicht. Es ist unwahrscheinlich, daß diese kleine Eisenmenge für sich allein in den Blättern der Tomatensprosse die charakteristischen Eisennekrosen verursacht; denn bei diesem Mengenverhältnis hat nur rund 1 Lycomarasminmolekel auf 1000 ein Eisenion angelagert erhalten. Die Erklärung liegt wohl darin, daß die Eisenmenge, die sich das Lycomarasmin auf seinem Wanderungswege spontan anlagerte, für sich allein nahezu ge-

nügte, um in den Blättern Eisenüberschwemmungsschäden auszulösen, so daß es nur noch einer kleinen zusätzlichen Dosis bedurfte, um die Schädigungsschwelle manifest zu überschreiten.

Die geringe Stabilität der Lycomarasmin-Eisen-Komplexe beruht nicht nur auf dem verhältnismäßig geringen Komplexbildungsvermögen der beiden Partner, sondern insbesondere auf der Photosensibilität der Lycomarasmin-Ferri-Komplexe, die im Lichte den Zerfall dieser Komplexe beschleunigt; deshalb wechseln im Zellinnern Photoreduktion und Reoxydation der Lycomarasmin- und der Komplexon-III-Eisen-Komplexe dauernd ab, welcher Vorgang schließlich mit der Bildung von Eisenhydroxyd endet.

Summary

1. To komplexon III as a model substance and to lycomarasmin as an example of a real wilting toxin, increasing quantities of Mg-, Mn-, Fe-, Co-, Ni-, and Cu-ions respectively were added before their introduction in the tomato cuttings. From the changes in the toxicity of these two substances, produced as a result of the „pre-infectional" combination with the metal ions, we hoped to get an idea about the mechanism of their pathogenic effect on the host cells.

2. With regard to the firmness of the coordinative linkage, the heavy metal complexes of both the substances arrange themselves according to the Mellor-Maley's stability series and there is no indication as to a selective chelation of the given metals.

3. The pathogenic effect of the different metal complexes for the young tomato cuttings is determined on one hand by the degree of firmness of the coordinative linkages and on the other by the injurious effect of the metal ions in question.

By increasing saturation with magnesium ions, which are the weakest complex producers, the injurious effect of komplexon III and lycomarasmin for young tomato cuttings is not changed (fig. 1 and 3, curve Mg^{++}). The magnesium ions are obviously set free within the cells, but they cause no damage because the magnesium ions are non-injurious.

In the case of manganese, the capacity to form coordinative linkages is great enough to detoxicate a strong chelating agent like komplexon III down to 61 % of its natural toxicity (fig. 1, curve Mn^{++}). On the other hand, the chelate complexes of manganese with a weak chelating agent like lycomarasmin desintegrate at once in the interior of the host cells; for that reason the addition of manganese does not decrease the toxicity of lycomarasmin (fig. 3, curve Mn^{++}). The liberated manganese ions cause no damage to the cells in the amounts used here.

In the case of cobalt, nickel and copper, the coordinative linkages are strong enough so that their complexes with komplexon III and with lycomarasmin remain stable in the host cells. Both chelating agents are, therefore, detoxicated (under conditions of suboptimal saturation) by increasing quantities of these three ions respectively. The metals in this case do

not play any part in producing symptoms- the latter being produced only by the chelating agents. The maximum inhibition of toxicity is attained at equimolecular saturation of the chelating agents (figs. 1 and 3). For the lycomarasmin-cobalt-complexes the minimum of the injury curve lies at 38 %, for the nickel-complexes at 34 % and the copper-complexes at 18 %: copper is able, therefore, to detoxicate lycomarasmin to 18 % of its normal range. — If the three, above named metals are added to the chelating agents in quantities above the equimolecular saturation range, the metal ions are set free within the cells in increasing quantities and cause there the corresponding metal injuries (e. g., fig. 4).

4. In so far as komplexon III and lycomarasmin cause injuries to tomato plants in their capacity as chelating agents, their critical range of damage lies in the sector of i r o n. The iron occupies a middle position as regards its capacity for complex formation on one side and its toxicity for tomato plants on the other. Its complexes decompose within the cells obviously as easily as those of magnesium and manganese and, on the other hand, the iron is as toxic to the tomato cuttings as cobalt, nickel and copper.

In relation to iron, the effect of lycomarasmin is ambivalent. On the one hand lycomarasmin causes deficiency symptoms in the host cells by chelating the iron from other organic associations and on the other it causes flooding injuries by liberating the chelated iron at „wrong" places in the host. Since the flooding injuries appear suddenly on the host, it is supposed that they are caused by closely limited and specific injury reactions. It is held presumable that the iron ions which are taken up by lyco marasmin on its way through the stem and which are set free afterwards in the leaf tissues play a decided rôle in the appearance of the flooding injuries. For instance when lycomarasmin is given (before the application to the host) a dose of 0,04 mg of iron per kg life weight, visible iron-injury symptoms do not appear in the tomato cuttings, but they do appear with 0,06 mg iron per kg life weight. It is improbable that this small dose of iron alone is responsible for the appearance of the characteristic iron necrosis, because at this ratio only about 1 in 1000 lycomarasmin molecules is bound up with one iron ion. The explanation lies therein that the quantity of iron which lycomarasmin takes up during its course of movement is for itself almost sufficient to cause iron flooding injuries in the leaves so that only a very small extra dose is required to cross over the threshold of visible iron injury.

The low stability of the lycomarasmin-iron-complex depends not only on the relatively small capacity for complex formation of both the partners, but especially on the p h o t o s e n s i b i l i t y of the lycomarasmin-ferri-complex which in light favours the decomposition of the complex. Accordingly, processes of photoreduction and reoxydation of the lycomarasmin- and the komplexon-III-iron-complexes alternate within the cells and this process ends ultimately with the production of iron hydroxide within the cells.

Literaturverzeichnis

Gäumann, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. Birkhäuser, Basel, 681 S.

— — und Jaag, O., 1947: Die physiologischen Grundlagen des parasitogenen Welkens I—III. Ber. Schweiz. bot. Ges. **57**, 3—34, 132—148, 227—241.

— — und Naef-Roth, St., 1955: Über die chelierende Wirkung einiger Welketoxine II. Die Verschiebungen der Toxizität durch steigende Zusätze von Asche aus jungen Tomatenprossen. Phytopath. Z. **23**, 147—160.

— —, — — und Kern, H., 1955: Über die chelierende Wirkung einiger Welketoxine III. Die Verschiebungen der Toxizität durch steigende Absättigung mit Eisenionen. l. c., **24**, 373—406.

— —, — — und Miescher, G., 1950: Untersuchungen über das Lycomarasmin. l. c., **16**, 257—288.

Hein, F., 1950: Chemische Koordinationslehre. Hirzel, Zürich, 683 S.

Hill-Cottingham, D. G., 1955: Photosensitivity of iron chelates. Nature **175**, 347—348.

Jones, S. S., and Long, F. A., 1952: Complex ions from iron and ethylendiamintetra-acetate: general properties and radioactive exchange. J. physical chem. **56**, 25—33.

Martell, A. E., and Calvin, M., 1952: Chemistry of the metal chelate compounds. New York, Prentice-Hall, 613 S.

Mellor, D. P., and Maley, L., 1947: Stability constants of internal complexes. Nature **159**, 370.

— —, — —, 1948: Order of stability of metal complexes. l. c., **161**, 436—437.

Tamari, K., and Kaji, J., 1952: Studies on the mechanism of injurious action of fusarinic acid on plant growth, 1—5. J. agr. chem. soc. Japan **26**, 223—227, 295—298, 298—303, 345—349, 349—353.

— —, — —, 1953: Studies on the mechanism of injurious action of fusarinic acid on plant growth, a metabolic product of the causative mould of "Bakanae" disease of rice plant, 6—8. l. c., **27**, 245—252, 302—306.

Waggoner, P. E., and Dimond, A. E., 1953: Rôle of chelation in causing and inhibiting the toxicity of Lycomarasmin. Phytopathology **43**, 281—284.

Kurze Mitteilung

Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Virusserologie, Braunschweig

Über die Haltbarkeit von angetrockneten Seren

Von

R. Bercks

Im Jahre 1948 wurde gemeinsam mit Stapp über Antrocknungsversuche mit Seren gegen die Kartoffelviren X und Y berichtet (2). Die Untersuchungen bauten auf einer Arbeit von Stapp und Marcus aus dem Jahre 1944 (3) auf; sie ergaben, daß sich die Seren an verschiedene Papiersorten gut antrocknen ließen und in geeigneten Konzentrationen ihre volle Wirksamkeit während der Versuchsdauer von 1¼ bis 1½ Jahren behielten. Für die serologischen Prüfungen wurden kleine Papierstückchen (etwa 4 × 4 mm) verwendet, von denen das Serum durch einen Tropfen physiol. Kochsalzlösung gelöst wurde. Die „Blättchenmethode" hat gegenüber der Verwendung von flüssigem Serum den Vorteil, daß verhältnismäßig geringe Serummengen benötigt werden und die Papierblättchen bei Zimmertemperatur im Exsikkator aufbewahrt werden können. Das Verfahren hat sich bei einer größeren Zahl von Arbeiten über das Kartoffel-X-Virus bewährt und wird in großem Umfange von den deutschen Kartoffelzüchtern und z. T. auch in anderen Ländern zur Kontrolle des X-Virus in der Praxis angewandt.

Neuere Untersuchungen von Bercks und Zimmer (1) haben ergeben, daß sich an Papier angetrocknetes Antiserum auch zum Nachweis der virösen Rübenvergilbung eignet. Das gleiche wurde von Wetter (4) für das Kartoffel-S-Virus festgestellt. Ein entsprechendes Serum wird ebenfalls schon in erheblichem Maße in der deutschen Kartoffelzüchtung verwendet.

Wegen dieser verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten der Blättchenmethode interessiert die Frage, wie lange angetrocknetes Serum seine Wirksamkeit behält. Aus diesem Grunde wird im folgenden kurz über Versuche mit Antiserum gegen das Kartoffel-X-Virus berichtet, die sich über mehrere Jahre erstreckten.

Im Jahre 1946 angetrocknete Seren, über die bereits in der eingangs erwähnten Arbeit (2) berichtet wurde, prüften wir weiterhin in den Jahren 1950, 1954 und im März und Oktober 1955. Die Seren wurden in Mengen von 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 und 0,4 ccm auf je 12 qcm große Stücke von acht verschiedenen Papiersorten gebracht worden, nachdem ihnen zuvor je 3 % oder 6 % Fruktose, Glukose, Laktose oder Maltose zugesetzt worden waren[1]). Eine Kontrolle war jeweils ohne Zucker geblieben. Es bestätigte sich, daß nur geringe Unterschiede in der Brauchbarkeit der einzelnen Papiere bestanden und ein Zuckerzusatz die Reaktionsstärke im allgemeinen begünstigte. In der früheren Veröffentlichung (2) war mitgeteilt worden, daß gute Reaktionen kurze Zeit nach der Antrocknung teilweise sogar mit der geringsten Serummenge von 0,025 ccm erhalten wurden. Die Reaktionsstärke ließ aber bald nach. Ebenso war die Haltbarkeit dieser Blättchen — von Ausnahmen abgesehen — nur gering. Dabei zeigte sich meistens, daß die Kontrollen ohne Zuckerzusatz zu einem früheren Zeitpunkt versagten. Bis zu einem gewissen Grade ließ sich dies auch bei höheren Serumkonzentrationen beobachten. Der Zucker hatte also nicht nur eine fördernde Wirkung auf die Reaktionsstärke, sondern auch auf die Haltbarkeit der Seren.

Bei den höheren Serumkonzentrationen (von 0,2 ccm an) blieb die Reaktionstärke in den meisten Fällen bis zum Ende des Versuchs erhalten. Teilweise war das auch bei den Konzentrationen 0,05 und 0,1 der Fall.

Die Reaktionsstärke, die jeweils mit unverdünnten, virushaltigen Pflanzensäften gemessen wurde, gibt allerdings kein eindeutiges Maß für die Brauchbarkeit bzw. Haltbarkeit der angetrockneten Seren. Für diese Beurteilung muß geprüft werden, bis zu welcher Verdünnung die Preßsäfte mit Antiserum reagieren. In Tabelle 1 sind einige Beispiele dafür aufgeführt worden, daß sich Reaktionstärke und Safttiter oft nicht gleichsinnig verhalten.

Tabelle 1

Serum Nr.	1946	1950		1954	März 1955	Oktober 1955	
	Reaktionsstärke*	Reaktionsstärke	Safttiter	Reaktionsstärke	Reaktionsstärke	Reaktionsstärke	Safttiter
1	3,4	1,5	1 : 70	3,2	3,3	2,8	1 : 30
2	1,2	1,2	1 : 25	2,4	1,6	3,0	1 : 1
3	2,5	3,0	1 : 10	2,0	3,1	3,5	1 : 1

* Mittelwerte aus mehreren Beobachtungen, Bonitierungsschema 0—4.

Serum Nr. 1 ergab im Jahre 1950 mit unverdünntem Preßsaft nur eine Reaktionsstärke von 1,5 und reagierte bis zu einer Preßsaftverdünnung von 1 : 70. Im Oktober 1955 reagierte dasselbe Serum — bei einer Reaktionsstärke von 2,8 mit unverdünntem Saft — nur bis zur Saftverdünnung 1 : 30. Noch größere Unterschiede ergaben sich bei den beiden anderen aufgeführen Seren.

[1]) Für eine serologische Reaktion wurden demnach bei Verwendung von 4 × 4 cm großen Papierblättchen etwa 0,0015 ccm Serum benötigt, wenn auf 12 qcm Papier 0,1 ccm angetrocknet wurde.

Die Schwankungen in der Reaktionsstärke sind z. T. darauf zurückzuführen, daß zu den verschiedenen Zeiten verschiedene Preßsäfte benutzt wurden.

In der früheren Mitteilung (2) war angegeben worden, daß bei brauchbaren Seren die Grenze für die Präzipitatbildung ungefähr bei einer Preßsaftverdünnung von 1 : 50 lag. Die weiteren Prüfungen ergaben, daß derartige Seren im Jahre 1950 noch in gleicher Weise reagierten, wenn sie in einer Menge von wenigstens 0,1 ccm angetrocknet worden waren. Dagegen war der Safttiter im Oktober 1955 in den meisten Fällen auch bei der Prüfung mit höheren Serummengen mehr oder weniger stark gesunken.

Aus den Versuchen kann daher geschlossen werden, daß gute Seren, wie sie vom Institut für Virusserologie zur Diagnose des Kartoffel-X-Virus abgegeben werden, ihre volle Brauchbarkeit mindestens vier Jahre behalten. Zur Erhöhung der Sicherheit werden von diesen Seren nicht 0,1, sondern 0,2 ccm angetrocknet. Die Serumblättchen können bei sachgemäßer Aufbewahrung im Exsikkator unter ständigem Ausschluß der Luftfeuchtigkeit ohne Bedenken mehrere Jahre bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

Literaturverzeichnis

1. Bercks, R. und Zimmer, K., 1956: Untersuchungen über die viröse Rübenvergilbung. Phytopath. Z. **25**, 255—266.

2. Stapp, C. und Bercks, R., 1948: Über weitere Antrocknungsversuche mit Seren gegen Kartoffelviren. Phytopath. Z. **15**, 47—53.

3. — — und Marcus, O., 1944: Beiträge zur weiteren Vereinfachung der serologischen Virusdiagnose. Zbl. Bakt. **II**, **106**, 465—471.

4. Wetter, C. und Brandes, J., 1956: Untersuchungen über das Kartoffel-S-Virus. Phytopath. Z., im Druck.

Buchbesprechung

Miehe, H., Taschenbuch der Botanik. Bearbeitet von W. Mevius. Teil I: Morphologie, Fortpflanzung, Entwicklungsgeschichte, Physiologie. — 16., verbesserte Auflage, G. Thieme Verlag Stuttgart 1955. VIII, 286 S. 363 Abb., kart. 10,50 DM.

Der „Miehe-Mevius" gehört zum eisernen Bestand der botanischen Lehrbuch-Literatur, und, wie viele frühere Generationen, halten sich auch heute die Studierende immer wieder an dieses beliebte Taschenbuch, das die wichtigsten wissenschaftlichen Er kenntnisse in knapper Formulierung bringt. Es ist daher sehr zu begrüßen, daß de allgemeine botanische Teil nach sechs Jahren nunmehr neu aufgelegt ist und somit wiede den Anschluß an den gegenwärtigen Stand der Forschung gefunden hat. Man bemerk die sorgfältige Überarbeitung in allen Abschnitten. Am stärksten ist der Abschni „Physiologie" erweitert oder sogar abgeändert. Als sinnvolle Neuerung ist hier gleic im Anfang nach den „allgemeinen Betrachtungen" den Enzymen ein eigenes Kapit eingeräumt worden. Notwendig erwiesen sich dann vor allem erhebliche Umänderung bei der Darstellung der Photosynthese und der Dissimilation. Auch das Kapitel „En wicklung" trägt den Fortschritten Rechnung, die inzwischen die Wuchsstoff-Forschu erzielt hat.

Der Phytopathologe verzeichnet mit Befriedigung, wenn in der Neuauflage d Standpunkt vertreten wird, daß die Symbiosen in den meisten Fällen aus einem wechs seitigen Parasitismus hervorgegangen sein dürften. Zu wünschen wäre, wenn künf etwas ausführlicher auf die Viren — trotz oder gerade wegen ihrer Problematik — e gegangen werden könnte. Ref. vermag sich kaum zu denken, daß sich ein Anfänger den etwas recht kargen Ausführungen eine Vorstellung bilden kann.

Das äußere Bild des Buches ist nahezu das gleiche geblieben. Allerdings sind Abbildungen um rund 30 vermehrt worden; nicht zuletzt hat daraus die früher et stiefmütterlich bedachte Anatomie des Blattes Nutzen gezogen.

Hassebrauk, Braunschweig

Hundert Jahrgänge im Dienste der Landwirtschafts-Wissenschaft!

ZEITSCHRIFT FÜR ACKER- UND PFLANZENBAU

(früher Journal für Landwirtschaft)

Begründet 1853

Das wissenschaftliche Veröffentlichungsorgan
der deutschen Hochschulinstitute und Forschungsanstalten für die gesamte
Forschungsarbeit auf dem Gebiet des Acker- und Pflanzenbaues

Unter Mitwirkung von
Prof. Dr. E. KLAPP-Bonn, Prof. Dr. E. A. MITSCHERLICH-Paulinenaue
Prof. Dr. K. OPITZ-Berlin

herausgegeben von

Prof. Dr. W. **BROUWER** Stuttgart-Hohenheim und Prof. Dr. O. **TORNAU** Göttingen

Zur Zeit erscheint der Jubiläums-Band 100

Die traditionsreiche Zeitschrift erfaßt in Originalarbeiten die gesamte wissenschaftliche Arbeit auf dem Gebiet des Acker- und Pflanzenbaues. Der Praxis ermöglicht sie einen sicheren Einblick in den derzeitigen Stand der Forschung.

Das Heft 4 des Bandes 100 bringt ein ausführliches

GENERALREGISTER DER BÄNDE 1—100

in zweckdienlicher Aufteilung nach Fachgebieten. Sie sind, um den Überblick zu erleichtern, so weit unterteilt, daß sich die zusammengehörigen Spezialarbeiten rasch überblicken lassen. Diese selbst sind chronologisch angeordnet, weil sie vielfach aufeinander aufbauen und damit zugleich die Entwicklung kennzeichnen. — Ein alphabetisches Verzeichnis der Verfasser kommt Sonderwünschen entgegen.

Die Zeitschrift ist besonders wertvoll für alle Institute, die sich mit den theoretischen und angewandten Fragen des Acker- und Pflanzenbaues zu beschäftigen haben, ferner für Forscher, Kulturtechniker und Botaniker usw., die aus ihr für ihre wissenschaftlichen Forschungsarbeiten und ihre praktische Tätigkeit wertvolle Anregung schöpfen.

Erscheinungsweise:
Jährlich 6 Hefte in zwangloser Folge, 4 Hefte bilden einen Band. Jedes Heft umfaßt etwa 8 Druckbogen. Bezugspreis: je Druckbogen (16 Seiten) etwa DM 3,50. Die Hefte werden einzeln berechnet.

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

Seit Dezember 1955 liegt vor:

PAREYS ILLUSTRIERTES GARTENBAULEXIKON

Fünfte, völlig neugestaltete Auflage

unter Mitwirkung zahlreicher namhafter Fachleute des gärtnerischen Berufsstandes

aus dem In- und Auslande

herausgegeben von

Professor RICHARD MAATSCH
Direktor des Instituts für Zierpflanzenbau in Hannover

Zwei Bände A—K und L—Z

Band I (A—K): 653 Seiten mit 6489 Stichwörtern, 513 Abb., 194 Tabellen u. Übersichten
Ganzleinen DM 69,—, Halbleder DM 72,—

Pareys Illustriertes Gartenbaulexikon ist in seiner Neuauflage ein auf der Höhe seiner Zeit stehendes, reich illustriertes und auf das beste ausgestattetes Nachschlagewerk über alle Fragen des Gartenbaues. Sämtliche mit dem Gartenbau zusammenhängenden Gebiete werden von maßgeblichen Fachleuten in prägnanter Kürze, aber doch so erschöpfend behandelt, daß auch Wissenschaft und Praxis der Pflanzenzüchtung aus der Benutzung wertvolle Anregung und Gewinn ziehen können.

Erstmalig in dieser Form und dabei ausführlich dargestellt werden folgende für den Pflanzenschutz besonders wichtigen Sachgebiete:

Bodenkunde, Pflanzenernährung (Prof. Dr. H.-H. BAETGE) — Meteorologie, Klimatologie (Prof. Dr. W. GRUNDMANN) — Pflanzenzüchtung, Genetik (Prof. Dr. H. KAPPERT) — Allgemeiner Pflanzenschutz, Pflanzenschutz im Obst- und Gemüsebau, Pflanzenschutz im Zierpflanzenbau (Ob.-Reg.-Rat Dr. H. PAPE) — Botanik I: Anatomie, Morphologie, Ökologie, Physiologie (Prof. Dr. U. RUGE) — Botanik II: Pflanzengeographie, Soziologie, Systematik, Nomenklatur (Dr. EVA POTZTAL).

Das Werk erscheint in monatlichen Lieferungen. Jede Lieferung hat einen Umfang von etwa 96 Seiten. Der ermäßigte Subskriptionspreis der Lieferung beträgt DM 8,40. Das Werk wird voraussichtlich 14 Lieferungen umfassen. Nach Herausgabe der ersten sieben Lieferungen liegt jetzt vor: Band I (A—K).

Die oben angegebenen Preise für Band I und die Lieferungen gelten nur bis zum Ende der Lieferungsausgabe.

Für Bezieher in Einzellieferungen werden zu beiden Bänden Einbanddecken zum Stückpreis von DM 3,— (Ganzleinen) oder DM 6,— (Halbleder) ausgegeben.
Das Gesamtwerk wird voraussichtlich im August 1956 fertiggestellt sein.

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

Verlag: Paul Parey, (1) Berlin SW 68, Lindenstr. 44-47, Tel. 61 44 68/69. Herausgeber: Prof. Dr. E. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstr. 2, Prof. Dr. M. Klinkowski, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. Richter, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Straße 19. Printed in Germany. Druck von A. W. Hayn's Erben, Berlin SO 36. Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des auszugsweisen Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe, vorbehalten. — Erscheinungsweise: Jährlich etwa 10 – 12 Hefte (4 Hefte = 1 Band).